

**EUNICE CASSANEGO ILHA**

***Lactobacillus paracasei* FNU - ISOLADO DE FERMENTO DE  
UVA: AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS,  
RESISTÊNCIA A MICROENCAPSULAÇÃO POR "SPRAY  
DRYING E QUANTIFICAÇÃO EM IOGURTE POR PCR EM  
TEMPO REAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

**FLORIANÓPOLIS**  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Ilha, Eunice Cassanego

*Lactobacillus paracasei* FNU - Isolado de Fermento de Uva: Avaliação de Características Probióticas, Resistência a Microencapsulação por "Spray Drying e Quantificação em Iogurte por PCR em Tempo Real / Eunice Cassanego Ilha ; orientador, Ernani Sebastião Sant'Anna –Florianópolis, SC, 2015

125 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. *Lactobacillus paracasei*. 3. Fermento natural de uva. 4. Probiótico. 5. Microencapsulação. 6. PCR em tempo real. I. Sant'Anna, Ernani S.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.



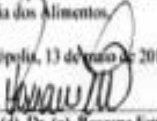
**LACTOBACILLUS PARACASEI FNU - ISOLADO DE FERMENTO  
DE UVA: AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS,  
RESISTÊNCIA A MICROENCAPSULAÇÃO POR "SPRAY  
DRYING" E QUANTIFICAÇÃO EM IOGURTE POR PCR EM  
TEMPO REAL**

Por

**Eunice Cassanego Itha**


Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de "Doutor  
em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo Programa  
de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

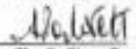
Florianópolis, 13 de maio de 2015.

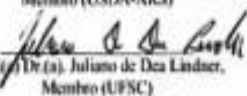
  
Prof. (a) Dr. (a) Rosane Fett  
Coordenador


**Banca Examinadora:**

  
Prof.(a) Dr.(a). Ernane Schmitz Sant' Anna,  
Orientador (UFSC)

  
Prof.(a) Dr.(a). Angela Maria Fiorentini,  
Membro (UFPel)

  
Prof.(a) Dr.(a). Anra Claudia Simas Porto - Fett,  
Membro (USDA-ARS)

  
Prof.(a) Dr.(a). Juliano de Dea Lindner,  
Membro (UFSC)

  
Prof.(a) Dr.(a). Eliane Schwinden Pradência,  
Membro (UFSC)



Este trabalho é dedicado aos meus pais Oswaldo (*in memoriam*) e Aracy,  
e aos meus filhos Tiago e Valentina, por quem tudo vale a pena.



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Ernani S. Sant'Anna, pela confiança e orientação.

À professora Ana Carolina pela parceria no trabalho com seus conhecimentos em biologia molecular e pelo incentivo.

À professora Elane Prudêncio pela parceria neste e nos demais trabalhos envolvendo probióticos.

Ao cientista de Alimentos, Tiago da Silva, por ter me acompanhado durante todo o trabalho de bancada, sendo sempre ético e responsável com os resultados desta pesquisa, pela sua amizade, companheirismo e paciência.

Ao professor Pedro Barreto pela participação na banca do exame de qualificação, com valiosas sugestões e pela utilização do laboratório na preparação das microcápsulas.

Aos colegas de laboratório, Thomás, Mirella e Diana, pela parceria em parte deste trabalho e aos demais colegas do BIOTEC, pelos bons momentos compartilhados.

À amiga, companheira de sala e de curso, Juliana Lorenz, que sempre esteve presente, pelas palavras de incentivo e pelo auxílio na estatística quando da elaboração do primeiro artigo científico originado desta tese.

Às alunas do laboratório de tecnologia de leites, em especial a Silvani e Maria Helena pelo auxílio na produção do iogurte e do soro de queijo.

Ao colega Sérgio de Souza, secretário do PGCAL, pelo trabalho realizado na secretaria e, sobretudo pela amizade de tantos anos.

À Dr<sup>a</sup> Jaciara Mazo, pela participação na banca do exame de qualificação, pelas contribuições ao trabalho e pela amizade.

À Dr<sup>a</sup> Krischina Aplevickz, pela contribuição com a cepa que foi objeto deste estudo e pelo incentivo na fase inicial do doutorado.

À Mestranda Michelle, por ter sido uma voluntária sempre presente e pronta para auxiliar e aprender o que fosse necessário para o andamento dos trabalhos no laboratório.

À Gabriela Rocha, pelo auxílio na utilização do spray dryer quando da produção das microcápsulas.

Ao pessoal do laboratório de Microscopia Eletrônica da UFSC, pelas análises microscópicas das microcápsulas.

À minha família e meu companheiro Fábio, pela presença na minha vida e por compartilharem de minhas conquistas.

A todos que, de uma forma ou de outra, estiveram comigo nestes quatro anos de curso, o meu reconhecimento e minha gratidão.





## RESUMO

Cepas de *Lactobacillus paracasei* têm demonstrado possuírem propriedades probióticas “in vitro” quando isoladas de seres humanos, soja fermentada e azeitonas, entre outras fontes. Os efeitos benéficos atribuídos às bactérias probióticas estão fortemente relacionados à capacidade de sobrevivência à passagem no trato digestório e às propriedades antipatogênicas, seja pela competição por nutrientes, produção de substâncias antimicrobianas e/ou exclusão competitiva. Um dos desafios tecnológicos para a produção industrial de células probióticas é que estas devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a resistência de *Lactobacillus paracasei* FNU (isolado de fermento natural de uva) ao processo de secagem por pulverização (“spray drying”) usando leite desnatado e soro de queijo líquido como material de parede; avaliar a tolerância “in vitro” da forma livre e microencapsulada a valores de pH e sais biliares nas concentrações semelhantes às encontrados no trato digestório humano; testar a tolerância ao cloreto de sódio e sobrevivência ao tratamento térmico; avaliar a capacidade de inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes, bem como produzir um produto lácteo (iogurte) com adição da cepa de *L. paracasei* e acompanhar sua viabilidade durante o armazenamento sob refrigeração. A sobrevivência a pH ácido foi testada utilizando caldo MRS com pH ajustado para 2,0; 3,0; 5,0 e 7,0 com contagens efetuadas após 0, 1, 2 e 3 h de incubação a 37 °C. Tolerância a bile foi avaliada utilizando caldo MRS adicionado de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0% de sais biliares, após 0, 3, 6, 9 e 12 horas de incubação a 37 °C. Tolerância ao sal foi testada por exposição de *L. paracasei* a 0,0, 1,0, 1,5 e 2,0% de NaCl (em caldo MRS), durante 3 horas de incubação a 37 °C. *L. paracasei* foi enumerado por contagem em placas de ágar MRS com sobrecamada, incubadas a 30 °C por 48 horas. A morfologia das microcápsulas foi determinada por microscopia eletrônica de varredura. Para a detecção da atividade antimicrobiana da cepa em estudo, foi utilizado o sobrenadante de um cultivo de *L. paracasei* FNU em caldo MRS, neutralizado e esterilizado por filtração. A atividade antibacteriana do sobrenadante foi testada contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028 através de ensaio de difusão em poços. Na produção de iogurte foi utilizada cultura láctica comercial composta por *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. *L. paracasei* FNU foi adicionado na forma livre, diretamente no iogurte produzido e a viabilidade foi determinada pelo período de 28 dias através de enumeração em Agar MRS e quantificação por PCR em tempo real. *L. paracasei* demonstrou possuir resistência “in vitro” aos sais biliares e a baixo pH e a microencapsulação em leite em pó desnatado e soro de leite proporcionou uma boa proteção contra os sais biliares e a pH ácido. A cepa produziu substâncias inibidoras contra *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*. Foram observadas diferenças entre a enumeração por PCR em tempo real e contagens em placas apenas 28 dias após a preparação do iogurte, enquanto que as contagens foram semelhantes entre os dois métodos aos 7, 14 e 21 dias. *L. paracasei* FNU na sua forma livre foi capaz de sobreviver por pelo menos 28 dias em iogurte refrigerado.

**Palavras chave:** *Lactobacillus paracasei*; fermento natural de uva; probiótico; microencapsulação; PCR em tempo real.

## ABSTRACT

*Lactobacillus paracasei* strains have demonstrated probiotic properties "in vitro" when isolated from humans, fermented soy and olives, among other sources. The beneficial effects attributed to probiotic bacteria are strongly related to their ability to survive the passage through the gastrointestinal tract and antipathogenic properties either by competition for nutrients, production of antimicrobial substances and/or competitive exclusion. One of the technological challenges for industrial production of probiotic cells is that they should remain stable and viable at satisfactory levels throughout the shelf life of the product. The objectives of this study were to evaluate the resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from natural grape sourdough to the spray drying process using skim milk and whey as wall material; to evaluate the tolerance "in vitro" of free and microencapsulated cells to pH and bile salts in concentrations similar to those found in the human gut; to test the tolerance to sodium chloride and survival to the heat treatment; to evaluate the ability to inhibit pathogenic and spoilage bacteria, as well as producing a dairy product (yogurt) with addition of *L. paracasei* FNU and to verify its viability in yoghurt by plate count and real time PCR (qPCR) during storage. The survival at acidic pH was tested using MRS broth with pH adjusted to 2.0, 3.0, 5.0 and 7.0 (control) incubated at 37 °C and samples were taken at one hour intervals for enumeration up to 3 hours of incubation. Tolerance to bile was evaluated using MRS broth added of 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0% bile salts, with samples collected after 0, 3, 6, 9 and 12 hours incubation at 37 °C. Salt tolerance was tested by *L. paracasei* FNU exposure to MRS broth 0.0, 1.0, 1.5 and 2.0% NaCl for up to 3 hours of incubation at 37 °C. *L. paracasei* was enumerated by direct plating onto MRS agar plates overlayed and incubated at 37 °C for 48 hours. The morphology of the microcapsules was determined by scanning electron microscopy. For the detection of antimicrobial activity, we used the supernatant of *L. paracasei* FNU grown in MRS broth, neutralized and sterilized by filtration. The antibacterial activity of the supernatant was tested against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 using the well diffusion method. In the yogurt production we used commercial lactic culture consisting of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *L. paracasei* was added in free form, directly to the final product, and the viability was determined by direct plating onto agar MRS and

quantification by real time PCR for up to 28 days. *L. paracasei* demonstrated resistance "in vitro" to bile salts and low pH and the microencapsulation in skimmed milk powder and cheese whey provided a good protection against bile salts and acidic pH, the strain was able to produce inhibitory substances against *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *B. subtilis*. Differences between qPCR and plate counts were observed only 28 days after yoghurt preparation, whereas no significant differences were observed between the two methods, counts were similar at 7, 14 and 21 days. Free cells of *L. paracasei* FNU were able to survive for at least 28 days in refrigerated yogurt.

**Keywords:** *Lactobacillus paracasei*; natural grape sourdough; probiotic; real time PCR; microencapsulation.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Representação esquemática da microencapsulação pelo método de *spray drying*.....39

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Verificação da produção de substância inibidora contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 (a) e *E. coli* ATCC 25922 (b) por *L. paracasei* FNU, através do método de camada tripla.....63

### CAPÍTULO 3

Figure 3.1: SEM images of microcapsules of *L. paracasei* FNU obtained by spray drying with skim milk and cheese whey a  $\times 1,000$  b  $\times 4,000$ ...82

Figure 3.2: Survival of free (FC) and microencapsulated (MC) *L. paracasei* FNU cells, incubated at 37 °C for 3 h in MRS pH 7.0, 5.0, 3.0 and 2.0.....85

Figure 3.3: Survival of free (FC) and microencapsulated (MC) *L. paracasei* FNU cells, incubated at 37° C for 12 h in MRS supplemented with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 g 100 mL<sup>-1</sup> bile salts.....85

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Curva padrão de qPCR para *L. paracasei* CCT 7501, obtida a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias.....108

Figura 4.2: Curvas padrão para *L. paracasei* FNU, obtidas a partir de cinco corridas de qPCR em diferentes dias, DNA extraído a partir de meio de cultura. (A) Ct versus log n° de cópias de DNA e (B) Ct versus log UFC de *L. paracasei* FNU.....109

Figura 4.3 Curva padrão para qPCR de *L. paracasei* FNU obtidas a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias, DNA extraído de iogurte com *L. paracasei* FNU dia 1.....111



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1.1: Microrganismos probióticos regulamentados pela Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)..... 31

Tabela 1.2. Valores de pH nas diferentes porções do trato digestório e tempo de permanência do alimento em cada porção..... 37

### CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Atividade antimicrobiana de *L. paracasei* FNU contra A: *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, D: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, E: *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028..... 65

Tabela 2.2: Sensibilidade do sobrenadante com atividade antimicrobiana à enzimas proteolíticas ..... 67

### CAPÍTULO 3

Table 3.1: Viable cell counts of *L. paracasei* FNU in the feed solution, in the microcapsules powder and encapsulation yield (EY).....81

Table 3.2: Survival of free and microencapsulated *L. paracasei* FNU at 65 °C .....86

### CAPÍTULO 4

Tabela 4.1: Rendimento e qualidade do DNA total obtido com cinco métodos de extração de DNA a partir de iogurte, leite e cultura bacteriana em caldo..... 105

Tabela 4.2: Ct e Tm obtidos por qPCR utilizando DNA extraído de *L. paracasei* (controles positivos) e outras espécies bacterianas (controles negativos). ..... 107



Tabela 4.3: Eficiências (E%) e Coeficientes de Correlação ( $R^2$ ) das curvas padrão de *L. paracasei* CCT 7501 e *L. paracasei* FNU realizadas em diferentes dias. .... 109

Tabela 4.4: Ct médio e Tm obtidos por qPCR usando DNA extraído a partir de iogurte controle e iogurte com *L. paracasei* FNU. .... 112

Tabela 4.5 Comparação das contagens de *L. paracasei* FNU (log UFC/mL) obtidas por qPCR e contagem em placas. .... 113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
AC	Ácido acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de microorganismos Norte americana. Do inglês “American Type Culture Collection”.
BAL	Bactérias láticas
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração. Do inglês Brain Heart Infusion
Caco-2	Células do adenocarcinoma de cólon humano. Do inglês “epithelial colorectal adenocarcinoma cells”.
CnBP	Proteína de ligação do colágeno. Do inglês “Collagen binding protein”.
Ct	Ciclo threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico. Do inglês, deoxyribonucleic acid
DO	Densidade óptica
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas. Do inglês Food and Agriculture Organization
FNU	Fermento natural de uva
GC	Guanina/Citosina
GRAS	Geralmente Reconhecidos Como Seguros. Do inglês Generally Recognized As Safe
LC	<i>Lactobacillus casei</i>
MAPA	Proteína promotora de adesão à mucosa. Do inglês Mucous Adhesion Protein
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MRS	De Man, Rogosa e Sharp
Mub	Proteína de ligação da mucosa
NA	Ágar nutriente. Do inglês “Nutrient Agar”.
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase. Do inglês Polymerase Chain Reaction
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa. Do inglês quantitative Polymerase Chain Reaction
Tm	Temperatura de melting
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	Organização Mundial da Saúde. Do inglês World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
1.1 Microrganismos probióticos .....	27
<b>1.1.1 Bactérias ácido lácticas.....</b>	<b>31</b>
1.2 Microencapsulação .....	36
<b>1.2.1 Métodos de encapsulação.....</b>	<b>38</b>
<b>1.2.2 Principais agentes utilizados na microencapsulação de microrganismos probióticos .....</b>	<b>41</b>
1.3 Enumeração de lactobacilos em produto lácteo.....	43
1.4 REFERÊNCIAS .....	46
<b>2 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DE <i>L. paracasei</i> FNU .....</b>	<b>59</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	59
2.2 MATERIAL E Métodos.....	60
<b>2.2.1 Microrganismos.....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.2 Produção de substâncias antimicrobianas.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3 Verificação da atividade antibacteriana do sobrenadante ...</b>	<b>61</b>
<b>2.2.4 Verificação da natureza proteica da substância ativa .....</b>	<b>62</b>
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
<b>2.3.1 Produção de substâncias antimicrobianas.....</b>	<b>63</b>
<b>2.3.2 Verificação da atividade antibacteriana do sobrenadante ...</b>	<b>64</b>
<b>2.3.3 Verificação da natureza proteica da substância inibidora ...</b>	<b>66</b>
2.4 CONCLUSÃO.....	68
2.5 REFERÊNCIAS .....	68

<b>3</b>	<b><i>Lactobacillus paracasei</i> ISOLATED FROM GRAPE SOURDOUGH: ACID, BILE, SALT, AND HEAT TOLERANCE AFTER SPRAY DRYING WITH SKIM MILK AND CHEESE WHEY .....</b>	<b>73</b>
3.1	INTRODUCTION .....	74
3.2	MATERIALS AND METHODS .....	77
3.2.1	Strain and culture condition .....	77
3.2.2	Microencapsulation of <i>L. paracasei</i> FNU by spray drying....	77
3.2.3	Physical properties of the microcapsules.....	78
3.2.4	Effect of pH and bile salts on survival of free and microencapsulated bacteria.....	79
3.2.5	Tolerance to NaCl.....	79
3.2.6	Heat resistance assay .....	79
3.2.7	Data analysis .....	80
3.3	RESULTS And DISCUSSION.....	80
3.3.1	Encapsulation yield (EY) .....	80
3.3.2	Physical properties of the microcapsules.....	81
3.3.3	Effect of pH and bile salts on survival of free and microencapsulated <i>L. paracasei</i> FNU.....	83
3.3.4	Tolerance to NaCl.....	85
3.3.5	Heat resistance .....	86
3.4	CONCLUSIONS.....	87
3.5	REFERENCES.....	87
<b>4</b>	<b>COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO E COMPARAÇÃO ENTRE PCR EM TEMPO REAL E MÉTODO DE PLAQUEAMENTO PARA ENUMERAÇÃO DE <i>L. paracasei</i> EM IOGURTE .....</b>	<b>95</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	97
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	99

4.2.1	Microrganismos e condições de cultivo .....	99
4.2.2	Preparação da cultura de <i>L. paracasei</i> FNU para adição no iogurte .....	100
4.2.3	Preparação do iogurte .....	100
4.2.4	Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA.....	101
4.2.5	Protocolo de extração de DNA da cultura bacteriana .....	101
4.2.6	Protocolo de extração de DNA de iogurte: método DNAzol 2 .....	101
4.2.7	PCR em tempo real ( qPCR).....	102
4.2.8	Construção das curvas padrão .....	102
4.2.9	Enumeração de <i>L. paracasei</i> por qPCR .....	103
4.2.10	Enumeração de <i>L. paracasei</i> por plaqueamento direto....	103
4.3	RESULTADOS .....	104
4.3.1	Comparação do rendimento e pureza do DNA extraído por meio de cinco protocolos .....	104
4.3.2	Especificidade do iniciador para <i>L. paracasei</i> .....	106
4.3.3	Parâmetros da qPCR para enumeração de <i>L.paracasei</i> .....	108
4.3.4	Enumeração de <i>L. paracasei</i> em amostras de iogurte .....	111
4.4	DISCUSSÃO .....	114
4.5	REFERÊNCIAS .....	115



## INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo de microrganismos Gram positivos, com baixa percentagem de GC (Guanina/Citosina), ácido tolerantes, que produzem ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos. São amplamente utilizadas como iniciadores ou culturas suplementares em alimentos fermentados como produtos lácteos, carnes, vinhos, cervejas, fermentos para a panificação e ensilagem (LEROY; DE VUYST, 2004). Estas bactérias também são utilizadas como probióticos, por seus efeitos benéficos ao ser humano e animais (PAROLO et al., 2011).

Lactobacilos são associados à produção de alimentos por possuírem ação conservante devido a acidificação e/ou pela sua habilidade de melhorar a textura, sabor e valor nutricional. Causam rápida diminuição do pH da matéria-prima por meio da produção de ácido lático. Além disso, a atividade proteolítica e produção de compostos de aroma, bacteriocinas e exopolissacarídeos são relevantes para a qualidade e valor nutricional do produto final e para aumentar o espectro de aplicações biotecnológicas deste importante grupo de BAL (LEROY; DE VUYST, 2004; STOYANOVA et al., 2012).

Nos últimos cem anos as BAL tem atraído a atenção de pesquisadores no mundo todo, principalmente pelos efeitos benéficos na saúde dos seres humanos e pela sua habilidade de preservar alimentos. A associação entre as BAL e a saúde humana foi primeiramente observada por Mechnikoff, no início do século XX, ao sugerir que muitas doenças eram causadas pelo efeito de várias toxinas e metabólitos produzidos por microrganismos presentes nos alimentos ingeridos. Pesquisando formas de prevenir o envelhecimento prematuro, ele descobriu a propriedade das BAL de inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que colonizam o trato digestório (ANUKAM; REID, 2007).

As diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos (FAO/WHO, 2006) recomendam a adoção da definição de probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

No conceito de alimentos funcionais, especialmente na indústria de laticínios, existe um interesse crescente em produtos probióticos que contenham bactérias lácticas. Pesquisas realizadas pelo North American Probiotics Markets for Human Nutrition revelam que um total de 698 milhões de dólares foi arrecadado pelo setor de pré e probióticos em 2006, com previsão de 1,70 bilhão de dólares para 2013, sendo o setor



das bebidas probióticas o de maior crescimento com taxa de crescimento anual de 24,6% (SAAD et al., 2011).

Cepas de bactérias lácticas probióticas devem ser escolhidas de acordo com critérios de seleção de modo a sobreviver à passagem através do trato digestório e, preferivelmente, colonizarem o trato intestinal durante um período suficientemente longo para atingir o efeito benéfico desejado. Uma das propriedades mais importantes dos probióticos é a proteção contra agentes patogênicos no trato intestinal do hospedeiro (SUSKOVIC et al., 2010). O mecanismo através do qual os probióticos podem antagonizar patógenos envolve a produção de compostos antimicrobianos, tais como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (PINTO et al., 2006).

BAL isoladas de fermentos naturais foram capazes de produzir diferentes substâncias inibidoras além de ácidos orgânicos, sendo algumas dessas substâncias, ativas contra cepas de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* (MESSENS; DE VUYST, 2002), leveduras (ATASSANOVA, 2003), e contra bolores, como *Fusarium proliferatum* e *Fusarium graminearum* (HASSAN; BULLERMAN, 2008).

Cepas de *Lactobacillus paracasei* têm demonstrado propriedades probióticas “in vitro” quando isoladas de humanos (GARDINER et al., 2000; BENDALI et al., 2011), soja fermentada (THI et al., 2003) e azeitonas (ARGYRI et al., 2013).

A sobrevivência dos probióticos no alimento é afetada por uma variedade de fatores incluindo pH, acidificação durante o armazenamento em produtos fermentados, produção de peróxido de hidrogênio, toxicidade do oxigênio (permeabilidade da embalagem ao oxigênio), temperaturas de armazenamento, estabilidade na forma desidratada ou congelada, crescimento deficiente em leite, carência de proteases para quebrar a proteína do leite a substâncias nitrogenadas mais simples e compatibilidade com a cultura iniciadora tradicional durante a fermentação (KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005). Por outro lado, probióticos administrados por via oral têm de ser consumidos em grandes quantidades e por meses consecutivos para alcançar sucesso na colonização do intestino do hospedeiro visto que, em geral, sofrem significativa perda de viabilidade e das funções probióticas devido às condições prejudiciais do trato digestório do hospedeiro. Para melhorar a sobrevivência das células probióticas em condições adversas e sua eficácia no hospedeiro, a microencapsulação se apresenta como uma alternativa de preservação dos microrganismos probióticos (ANAL and SINGH , 2007).

A microencapsulação envolve o revestimento ou encapsulamento de um núcleo com um material polimérico para gerar microesferas com um tamanho entre 10 e 100 µm. Esta tecnologia versátil tem sido utilizado para encapsular uma vasta gama de produtos, tais como produtos farmacêuticos, aromatizantes, óleos voláteis, extratos de plantas, enzimas e outros. Nas últimas décadas, esta tecnologia foi também aplicada à área de imobilização da célula microbiana (RATHORE et al., 2013). Neste caso, a principal finalidade da microencapsulação é proteger as células probióticas contra um ambiente desfavorável e permitir sua liberação na forma viável e metabolicamente ativa no intestino (NAZARRO et al., 2012).

Neste contexto, este trabalho baseou-se na hipótese de que uma cepa de *Lactobacillus paracasei* isolada de fermento natural de uva e identificada fenotípica e geneticamente por APLEVICZ e colaboradores (2014) possua propriedades desejáveis para utilização em alimentos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância desta cepa a sais de bile, calor, NaCl e baixo pH, verificar a capacidade da mesma de produzir metabólitos ativos na inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*, verificar sua resistência à microencapsulação por “spray drying” utilizando leite em pó reconstituído e soro de leite como encapsulantes e determinar sua viabilidade na forma livre em iogurte comparando a metodologia de cultivo e a quantificação por PCR em tempo real.

Esta tese está estruturada em capítulos, sendo que, além da revisão bibliográfica, são apresentados resultados de pesquisa de produção de compostos antimicrobianos por *L. paracasei* FNU e dois artigos, um publicado e outro submetido para publicação, compondo quatro capítulos:

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Capítulo 2: Verificação da atividade antimicrobiana “in vitro” de *Lactobacillus paracasei* FNU.

Capítulo 3: Artigo publicado “*Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey”.

Capítulo 4: Artigo submetido “Comparação de métodos de extração de DNA bacteriano e comparação entre PCR em tempo real e método de plaqueamento para enumeração de *L. Paracasei* em iogurte”.



# CAPÍTULO 1

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Em 1907, Elie Metchnikoff (cientista russo, prêmio Nobel e professor do Instituto Pasteur em Paris) postulou que as BAL ofereciam benefícios à saúde que promoviam a longevidade. Sugeriu que a “auto-intoxicação intestinal” e o envelhecimento resultante poderiam ser suprimidos modificando a microbiota intestinal e utilizando microrganismos benéficos para substituir os proteolíticos como *Clostridium*, produtores de substâncias tóxicas (fenóis, indóis, e amônia) oriundas da digestão de proteínas. Desenvolveu então uma dieta com leite fermentado com a bactéria que denominou de “bacilo búlgaro” (PERES et al., 2012).

Em 1917, o professor alemão Alfred Nissle isolou uma cepa não patogênica de *Escherichia coli* das fezes de um soldado da Primeira Guerra Mundial que não tinha desenvolvido enterocolite durante um surto grave de shigellose. A cepa de *Escherichia coli* isolada por Nissle é um dos poucos exemplos de um probiótico não BAL. No momento da demonstração científica dos benefícios das BAL por Metchnikoff, o pediatra francês Henry Tissier, trabalhando de forma independente, observou que crianças com diarreia tinham em suas fezes um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar em forma de Y. Essas bactérias “bífidas” eram, pelo contrário, abundantes em crianças saudáveis. Ele sugeriu que esses microrganismos bífidos poderiam ser administrados em pacientes com diarreia para auxiliar a restaurar a microbiota intestinal saudável (ANUKAM; REID, 2007).

No início dos anos 30, no Japão, o cientista Shirota focou suas pesquisas na seleção de cepas provenientes do trato intestinal humano que sobrevivessem à passagem pelo trato digestório e no desenvolvimento de leite fermentado. Seu primeiro produto contendo *Lactobacillus acidophilus* Shirota (mais tarde denominado *Lactobacillus casei* Shirota) foi a base para o estabelecimento da companhia Yakult Honsa (SOCCOL et al., 2010). O termo “probiótico” foi introduzido em 1965 por Lilly e Stillwell; definido como o fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos. Em 1989, Roy Fuller enfatizou o requisito de viabilidade para os probióticos e introduziu a ideia de que tais microrganismos produzem um efeito

benéfico para o hospedeiro melhorando o seu equilíbrio microbiano intestinal, tornando-se esta a definição mais aceita (ANUKAM; REID, 2007). Neste sentido, a viabilidade dos probióticos seria uma medida razoável de atividade probiótica, mas há situações em que a viabilidade celular não é requisito para a atividade probiótica, o que pode ser observado na melhora da digestão de lactose, algumas atividades de modulação do sistema imunológico e efeitos anti-hipertensivos. Nestes casos, efeitos benéficos à saúde têm sido associados a células não viáveis ou aos componentes celulares, atividades enzimáticas e de produtos de fermentação (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

Diversos microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e leveduras (DEVRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato digestório do ser humano saudável (SAAD, 2006). *Bifidobacterium* são Gram-positivas, estritamente anaeróbias e crescem em pH 4,5-8,5. São geralmente encontradas no intestino grosso de seres humanos. O gênero *Lactobacillus* é constituído de um grupo heterogêneo de espécies Gram-positivas, microaerófilas ou anaeróbias que variam amplamente em características metabólicas e de crescimento, tendo sido tradicionalmente utilizadas em fermentações de alimentos, especialmente produtos lácteos (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010).

De Macedo (2005) cita os seguintes critérios para um microrganismo ser empregado como probiótico: não apresentar patogenicidade; exercer um efeito benéfico à saúde do hospedeiro; ser Gram positivo; ser produtor de ácido e ser ácido resistente; apresentar especificidade ao hospedeiro; apresentar atividade inibitória contra *E. coli*; conter um grande número de células viáveis; ser isolado da mesma espécie animal a que se destina; resistir à ação da bile e lisozima e colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante mecanismos de adesão às células intestinais. De acordo com as diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos (FAO/WHO, 2006), os testes “in vitro” mais utilizados são resistência à acidez gástrica e aos sais biliares, baseados em estudos de sobrevivência e crescimento.

O trato digestório humano alberga um número de microrganismos que constitui um ecossistema equilibrado. A bile

desempenha um papel fundamental no mecanismo de defesa do intestino e seu efeito inibidor é determinado principalmente pela concentração de sais biliares, portanto, a tolerância à bile é considerada como uma característica importante de cepas de *Lactobacillus*, o que lhes permite sobreviver, multiplicar-se e exercer a sua ação no trânsito gastrointestinal (ARGYRI et al., 2013).

Supõe-se geralmente que uma boa capacidade de aderência é uma característica desejável para os *Lactobacillus* probióticos, pois isso pode permitir um bom tempo de permanência no intestino, a exclusão de patógenos e a interação com as células hospedeiras para a proteção do epitélio intestinal (SERVIN, 2004). A adesão à mucosa intestinal é importante para permitir que as células probióticas possam sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro. Até o momento, três proteínas diferentes que podem interagir com os componentes da mucosa intestinal foram identificados a partir de *Lactobacillus*: a proteína de ligação do colágeno (CnBP) de *Lactobacillus reuteri*, que interage com a mucina; a proteína promotora de adesão à mucosa (MAPA) de *Lactobacillus reuteri* 104R (TODOROV e DICKS, 2008) e a proteína de ligação da mucosa (Mub), de *Lactobacillus reuteri* 1063 (ROOS e JONSSON, 2002). A presença de genes codificadores dessas proteínas em bactérias lácticas pode ser imperativo, particularmente para as propriedades probióticas (TODOROV e DICKS, 2008).

Vários benefícios à saúde são atribuídos aos microrganismos probióticos, alguns deles comprovados cientificamente e outros ainda requerendo mais estudos em humanos (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Os principais efeitos benéficos relatados são: diminuição da intolerância à lactose, prevenção e redução dos sintomas da diarreia por rotavírus e associada a antibiótico, tratamento e prevenção de alergias, efeito antimutagênico e anticarcinogênico, efeito hipocolesterolêmico, inibição de *Helicobacter pylori* e patógenos intestinais, estímulo do sistema imunológico e melhora da doença inflamatória do intestino (SHAH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008; DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; MINOCHA, 2009).

Embora o trato digestório seja o local onde os lactobacilos probióticos exerçam a maioria dos benefícios à saúde, aplicações de algumas cepas de lactobacilos em outros locais do corpo humano mostraram-se promissoras, tais como a prevenção e tratamento de doenças urogenitais e vaginose bacteriana em mulheres (FALAGAS, 2007) e prevenção da cárie dentária (MEURMAN, 2007).

É importante enfatizar que os efeitos benéficos à saúde são dependentes da cepa, não podem ser preditos para uma determinada

espécie de microrganismo, assim como não há uma única cepa capaz de proporcionar simultaneamente todos os benefícios mencionados (SHAH, 2007, MINOCHA, 2009). Esses efeitos estão fortemente relacionados a capacidade de sobrevivência à passagem no trato digestório do hospedeiro. A bactéria deve ser metabolicamente estável e ativa no produto até o final de sua vida útil e alcançar o intestino em número suficiente para beneficiar a saúde (SHAH, 2007). Desta forma, para que um alimento seja considerado probiótico recomenda-se uma população de no mínimo  $10^6 - 10^7$  UFC/g do produto (FAO/WHO, 2006; SHAH, 2007). No Brasil, a legislação recomenda  $10^8 - 10^9$  UFC/100g do produto pronto para consumo (BRASIL, 2012). Sendo assim, um dos desafios tecnológicos para a produção industrial de células probióticas é que estas devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto (SAAD, 2006).

Tradicionalmente, evidenciam-se as propriedades antipatogênicas dos probióticos pela competição por nutrientes, produção de substâncias antimicrobianas e/ou exclusão competitiva. No entanto, também podem ocorrer interações sinérgicas entre probióticos e a microbiota endógena benéfica do hospedeiro (LEEBER et al., 2008).

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários processos que podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente. A exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e em elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008). Estudos moleculares de probióticos com foco em *Lactobacillus* spp visam identificar fatores que promovam a sobrevivência, a adaptação e colonização do hospedeiro (fatores de adaptação) e os fatores que contribuem diretamente para efeitos de promoção da saúde (fatores probióticos). Os efeitos benéficos são mediados por três mecanismos principais de ações probióticas, que incluem a inibição do patógeno, restauração do equilíbrio microbiano, melhoria da função de barreira epitelial, e efeitos imunomoduladores através de interações com células do sistema imune (LEBEER et al., 2008).

De acordo com vários relatórios, nos países em desenvolvimento, há uma necessidade de intervenção para prevenir e controlar as doenças diarreicas. Os probióticos podem oferecer uma intervenção segura nos casos de diarreia infecciosa aguda para reduzir a

duração e gravidade da doença. A última década testemunhou a validação da sua utilidade para a prevenção, tratamento e gestão de uma variedade de doenças infecciosas e não infecciosas. O campo mais investigado continua a ser diarreia infecciosa, através de ensaios randomizados controlados com placebo (SOLIS et al., 2002; HAJELA et al., 2010; ALLEN, 2011; FRANZ et al., 2014 ). A tabela 1.1 apresenta alguns microrganismos com propriedades probióticas regulamentados para uso em alimentos no Brasil.

Tabela 1.1: Microrganismos probióticos regulamentados pela Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Microrganismos probióticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei shirota</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei variedade defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i> )
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: BRASIL, 2008

### 1.1.1 Bactérias ácido lácticas

BAL são microrganismos Gram positivos que se apresentam na forma de bastonetes ou cocos, não esporulados, ácidos tolerantes, com baixa percentagem de GC (guanina/citosina) no genoma, catalase negativos, anaeróbios ou micro-aerófilos, que se caracterizam pela sua capacidade de fermentar açúcares em ácido láctico. Os gêneros mais conhecidos são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Alguns gêneros menos conhecidos de BAL são *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (PATEL, MAJUMDER, GOYAL, 2012).

Com base nas vias de fermentação das hexoses, os gêneros de BAL são classificados em duas categorias: homofermentativas, compreendendo o grupo I, que cataboliza um mol de glicose sob limitada disponibilidade de oxigênio na via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), obtendo apenas ácido láctico. Os membros deste grupo são



*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*. As BAL heterofermentativas que compõem o grupo II, utilizando a via das pentoses-fosfato para degradar o substrato liberando como produto final etanol e ácido láctico são representadas pelos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus* como *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* e *L. reuteri* (PATEL, MAJUMDER, GOYAL, 2012).

As BAL contribuem para o melhoramento de características organolépticas e também para a conservação e segurança microbiana de alimentos. Sua atividade antimicrobiana deve-se principalmente à produção de ácidos orgânicos (em particular, ácido láctico e ácido acético), dióxido de carbono, etanol, ácido fórmico, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio, diacetil e reuterina. A inibição, no entanto, também pode ser causada por bacteriocinas que são peptídeos de baixo peso molecular ou proteínas (substâncias inibidoras “tipo” bacteriocinas), as quais podem atuar como um agente bactericida ou bacteriostático, em particular contra espécies estreitamente relacionadas que são susceptíveis por residir no mesmo nicho ecológico (EIJSSINK et al., 2002; MESSENS, DE VUYST, 2002; DE VUYST, LEROY, 2007; TODOROV, 2009). A maioria das bacteriocinas de *Lactobacillus* são pequenas proteínas estáveis ao calor com um ponto isoeletrico elevado (classe II) que agem geralmente induzindo a permeabilização da membrana e o vazamento subsequente de moléculas de bactérias alvo. O espectro de inibição de algumas bacteriocinas também inclui microrganismos deteriorantes e patogênicos (EIJSSINK et al., 2002).

#### 1.1.1.1 Gênero *Lactobacillus*

Com mais de 100 espécies e subespécies, o gênero *Lactobacillus* representa o maior grupo dentro da família *Lactobacillaceae*. Os membros do gênero são bastonetes, muitas vezes organizados em cadeias. São aerotolerantes, mas crescem bem em condições de anaerobiose. Existem dois grupos da espécie, dependendo da capacidade de fermentar açúcares: espécies homofermentativas, convertendo açúcares principalmente em ácido láctico, e espécies heterofermentativas, que convertem açúcares em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub>. *Lactobacillus* preferem condições relativamente ácidas com pH entre 5,5 - 6,5 (GIRAFFA et al., 2010).

O gênero *Lactobacillus* é muito utilizado na fermentação de alimentos, principalmente na indústria láctea. Esses microrganismos possuem necessidades nutricionais complexas e são encontradas em

vários habitats, intestino delgado e mucosas de seres humanos e animais, material de origem vegetal e silagem, bem como em leites fermentados e alimentos em deterioração. Devido às suas potenciais propriedades terapêuticas e profiláticas, espécies de *Lactobacillus* foram também propostos como probióticos. (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; BENDALI et al., 2011).

Tuo et al. (2013) demonstraram que linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* e possuíam a capacidade de sobreviver às condições gastrointestinais simuladas, aderir a células Caco-2 (células do adenocarcinoma de cólon humano) e inibir agentes patogênicos entéricos concluindo que as cepas de *Lactobacillus rhamnosus* estudadas mostraram potencial para a utilização como probiótico aplicado a seres humanos.

Lactobacilos probióticos são considerados microrganismos GRAS (geralmente reconhecidos como seguros). No entanto, em casos raros, relatos de infecções provavelmente causadas por lactobacilos probióticos em pacientes imunodeficientes ou pacientes com doença subjacente grave têm sido publicados (LEBEER et al., 2008).

#### *1.1.1.1.1 Lactobacillus paracasei*

Diversos estudos demonstram a capacidade de cepas de *Lactobacillus paracasei* isoladas de diferentes fontes, de atuarem como probióticos e também como produtores de substâncias antimicrobianas. Vinderola e colaboradores (2009) observaram a viabilidade de *Lactobacillus paracasei* A13 em queijo fresco argentino durante o processo de fabricação do produto a 43 °C e durante o armazenamento e vida de prateleira a 5 °C, verificando um aumento na contagem em cerca de um ciclo logarítmico, sem afetar negativamente as propriedades sensoriais da matriz alimentar. A temperatura de armazenamento mais elevada (12 °C) permitiu um maior crescimento da cepa, porém afetou negativamente as características sensoriais do produto.

Chiang e Pan (2012) demonstraram a ação probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 101 NTU isolada de fezes de recém-nascido. O microrganismo mostrou boa sobrevivência em baixo pH, tolerância a altas concentrações de bile e provou ser eficaz no tratamento da hipertensão e hipercolesterolemia, na prevenção do desenvolvimento de lesão da mucosa gástrica, na imunomodulação e alívio de alergias, sendo também eficaz contra a osteoporose e inibindo a acumulação de tecido adiposo.

Valerio e colaboradores (2006) reportaram a capacidade de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* de sobreviverem em alcachofras por pelo menos 90 dias. A adição das cepas bacterianas em alcachofras melhorou sua sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas. *Lactobacillus paracasei* adicionado a alcachofra foi ainda utilizado em estudo de alimentação humana envolvendo quatro voluntários, e demonstrou-se que o microrganismo pôde ser recuperado a partir das fezes desses voluntários (VALERIO et al., 2006).

Patrignani et al. (2006) analisaram as características tecnológicas e funcionais de BAL isoladas de leite fermentado tradicional da região de Maasai, Kenya, utilizando essas cepas na produção de leites fermentados. Os resultados obtidos nessa investigação permitiram a seleção de algumas cepas potencialmente probióticas dotadas de interessantes propriedades tecnológicas. Em particular, as cepas de *Lactococcus. lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* mostraram alta viabilidade durante o armazenamento refrigerado, após acidificação rápida tanto em 30 °C quanto a 37 °C. Além disso, essas cepas deram origem a produtos de qualidade no que se refere a coesão, firmeza e consistência.

Kristo e colaboradores (2003) avaliaram os efeitos simultâneos da temperatura de fermentação, teor de sólidos totais do leite e a quantidade total de inóculo sobre as propriedades reológicas, cinética de acidificação e a multiplicação microbiana em leite fermentado contendo a cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* B117 em co-cultura com cultura iniciadora contendo *Streptococcus thermophilus* Y4.10 e *Lactobacillus bulgaricus* Y6.15. Os autores avaliaram, ainda, a viabilidade desses microrganismos, o perfil de ácidos orgânicos e a aceitabilidade sensorial do produto. *Lactobacillus paracasei* mostrou boa sobrevivência durante os 21 dias de armazenamento a 4 °C, com níveis superiores a 6 log UFC/mL, mostrando boa compatibilidade com os microrganismos iniciadores. Os autores concluíram que, em condições apropriadas de fermentação, a cepa *Lactobacillus paracasei* B117 pode ser usada com sucesso para a produção de leite fermentado com propriedades probióticas, em conjunto com culturas tradicionais.

Bendali et al. (2011) estudaram a cinética de produção e o modo de ação da substância “tipo bacteriocina” produzida por uma cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolada de fezes de recém nascidos. A substância antimicrobiana foi ativa contra *Listeria innocua* CLIP 74915 e *Listeria monocytogenes* EGDE, sendo que a produção

máxima da substância foi detectada no final da fase logarítmica de crescimento (14 h em caldo MRS e 18 h em caldo BHI).

Em outro estudo, Atanassova et al. (2003) relataram a produção de bacteriocina (43 kDa) por *Lactobacillus paracasei* subsp. M3, utilizada como fermento para queijo búlgaro amarelo. A atividade antimicrobiana foi eficaz contra mais de 60 cepas de bactérias e fungos, incluindo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactobacillus delbrueckii*, *Helicobacter pylori* NCIPD 230 e algumas espécies de leveduras como *Candida albicans*, *Candida pseudointermedia* NBIMCC 1532, *Candida blankii* NBIMCC 85 e *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 1812.

Arici et al. (2004) estudaram a atividade inibidora de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp isoladas de fezes de recém-nascidos e de crianças com até dois anos de idade, sobre bactérias contaminantes de alimentos ou patógenos. Os autores verificaram que quatro cepas de *Lactobacillus paracasei* (IF8, IF9, IF10 e IF11) demonstraram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 28213 e três cepas (IF8, IF10 e IF11) inibiram a multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 2392, em ensaios de difusão em ágar. Os autores concluíram que as cepas de *Lactobacillus paracasei* testadas poderiam contribuir para a manutenção da microbiota intestinal normal daquelas crianças, através da inibição da multiplicação de bactérias potencialmente patogênicas à saúde, prevenindo a ocorrência de doenças. Buriti et al. (2007) verificaram que *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em queijos frescos cremosos inibiram coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* DNase positivos, o que não foi observado para os queijos que não continham *Lactobacillus paracasei*. Os autores concluíram que a inibição desses microrganismos possivelmente ocorreu pela produção de ácidos por *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus thermophilus*, já que a produção de bacteriocinas não foi observada.

*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005 isolado de fezes de crianças saudáveis também mostrou uma notável atividade antibacteriana contra 32 cepas bacterianas patogênicas, entre as quais, 13 cepas pertencentes às espécies de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* eram resistentes a cefotaxima e ceftazidima, e quatro cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. A atividade antibacteriana foi atribuída a uma bacteriocina designada como paracaseicina. Este foi o primeiro estudo a informar sobre a caracterização e purificação de bacteriocina produzida por uma cepa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* exibindo atividade antibacteriana contra

várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multi resistentes a antimicrobianos (BENDJEDDOU et al., 2012).

Além da produção de bacteriocinas, algumas BAL são capazes de sintetizar outros peptídeos antimicrobianos que podem também contribuir para a conservação e segurança alimentar. Cepas de *Lactobacillus plantarum*, isoladas a partir de fermento e ensilagem, mostraram atividade antifúngica, devido à produção de ácidos orgânicos, a outros metabólitos de baixo peso molecular e/ou dipeptídeos cíclicos (LAVERMICOCCA et al., 2000; SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Na panificação, mesmo sob condições rigorosas de produção, o pão pode ser contaminado com bolores ou bactérias tais como *Bacillus subtilis* ou Clostridia, que podem posteriormente multiplicarem-se e deteriorar o produto. Para evitar o crescimento destes microorganismos contaminantes, é comum a adição de ácidos orgânicos ou cerca de 15% de fermento caseiro à receita da massa comum. O efeito fungistático do fermento caseiro natural é atribuído ao ácido láctico e, especialmente ao ácido acético, produzidos pelas cepas de BAL, visto que BAL são os microrganismos predominantes em fermento natural, juntamente com leveduras (MESSENS; DE VUYST, 2002). Hassan e Bullerman (2008) testaram o espectro de atividade antifúngica de duas cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isoladas de fermento caseiro contra espécies de três gêneros de bolores: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, representando fungos toxigênicos e deteriorantes. Os autores concluíram que os isolados mostraram uma forte atividade contra todas as espécies de *Fusarium*, seguida por espécies de *Penicillium* em menor grau. Espécies de *Aspergillus* foram mais resistentes à atividade antifúngica e foram os mais difíceis de inibir.

## 1.2 MICROENCAPSULAÇÃO

Antes de um probiótico beneficiar a saúde humana, é necessário cumprir vários critérios. Ele deve ter boas propriedades tecnológicas de modo a ser incorporado nos produtos alimentares sem perda de viabilidade e funcionalidade ou a criação de sabores e texturas desagradáveis. É preciso sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal superior e chegar vivo e bioativo em seu local de ação, preservando a sua capacidade para agir no ambiente intestinal. Outro requisito inclui a sua aplicação e distribuição uniforme na formulação do alimento, bem como a sua estabilidade durante o processamento do produto, distribuição e armazenamento. As soluções utilizadas para

esses problemas, muitas vezes fornecem proteção ineficiente às células probióticas, limitando assim a sua incorporação nos alimentos. Uma solução promissora neste caso é a microencapsulação de probióticos a fim de aumentar a resistência dessas bactérias ao congelamento e liofilização do alimento (SEMYONOV et al., 2010).

A microencapsulação representa um excelente exemplo de microtecnologia aplicada a ciência dos alimentos e biotecnologia, podendo ser aplicada com sucesso para encapsular compostos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais contendo polifenóis com propriedades antimicrobianas conhecidas a serem utilizados em embalagens para alimentos (NAZZARO et al., 2012).

Do ponto de vista microbiológico, microencapsulação pode ser definida como o processo de aprisionamento das células microbianas, por meio de revestimento com hidrocolóide adequado, a fim de separar as células do ambiente circundante, de forma a resultar na sua liberação apropriada no ambiente intestinal (PICOT; LACROIX, 2004; MORTAZAVIAN et al., 2007).

A microencapsulação tem sido proposta para melhorar a sobrevivência das cepas probióticas nas condições drásticas encontradas no trato gastrointestinal superior (PICOT e LACROIX, 2004; PRAKASH et al, 2011.; PAEZ et al., 2012). De acordo com Cook et al. (2012), ao planejar a encapsulação de microrganismos probióticos com o objetivo de proporcionar uma liberação controlada, é necessário considerar a complexa fisiologia do trato digestório (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Valores de pH nas diferentes porções do trato digestório e tempo de permanência do alimento em cada porção.

Região	pH	Tempo
Esôfago	$\pm 7,0$	10 – 14 seg.
Estômago	1,0 – 3,0	$\pm 80,5$ min
Intestino Delgado proximal	6,15 – 7,35	$\left\{ \begin{array}{l} 3,2 \pm 1,6 \text{ hs} \\ \text{Combinados} \end{array} \right.$
Intestino Delgado distal	6,80 – 7,88	
Cólon ascendente	5,26 – 6,72	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Altamente} \\ \text{Variável} \end{array} \right.$
Cólon descendente	5,20 – 7,02	

Fonte: Cook et al., 2012.

Embora a simulação *in vitro* não prediga respostas sobre a funcionalidade destes microorganismos no corpo humano, é útil na avaliação da sobrevivência de probióticos em diferentes matrizes alimentares durante a passagem através do trato digestório (LIAN et al., 2003; BURITI et al., 2010; PAEZ et al., 2012).

Além da matriz alimentar, a resistência do microorganismo probiótico às condições gastrointestinais depende das características intrínsecas de cada cepa e das condições de teste tais como a escolha do pH, presença e fonte de enzimas, e a temperatura e tempo de incubação (Favaro-Trindade e Grosso, 2002; Guerra et al., 2012).

Vários estudos têm sido desenvolvidos e extensivamente revistos em relação aos métodos de encapsulação, a formulação de materiais de parede, as propriedades sensoriais, estabilidade, etc (ANAL e SINGH, 2007).

### **1.2.1 Métodos de encapsulação**

Cada metodologia tem as suas próprias características e a seleção de qualquer método em particular é baseada na aplicação das microcápsulas. Por exemplo, microcápsulas contendo microorganismos probióticos devem ser menores do que 100 µm para evitar sensação arenosa quando consumidos (HEIDEBACH et al., 2012). Da mesma forma, as microcápsulas que contêm microorganismos fermentadores, para uso em biorreatores necessita ser mecanicamente forte para suportar as condições mecânicas e físicas severas, como forças de cisalhamento, ambientes ácidos, exposição a gases e solventes (COOK et al., 2012).

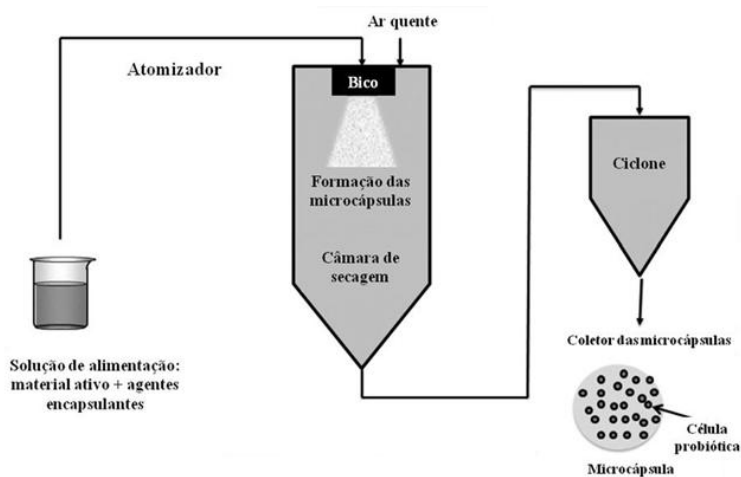
O produto probiótico microencapsulado ideal seria aquele que se apresenta em forma de pó, seco, com facilidade de armazenagem e uma vida de prateleira longa, ou um gel úmido com estabilidade a longo prazo num produto alimentar. A produção de probióticos encapsulados se dá através de três maneiras principais: extrusão, emulsão e secagem por atomização (“spray drying”), sendo que a maioria das pesquisas são realizadas pelas tecnologias de extrusão e emulsão (COOK et al. 2012).

A secagem por atomização (“spray drying”) é um dos métodos mais antigos de encapsulação, usado na década de 1930 para preparar os primeiros compostos de sabor encapsulados (MURUGESAN, ORSAT, 2012).

“Spray-drying” é um processo predominante na indústria de laticínios que pode ser utilizado para produzir grandes quantidades de ingredientes lácteos com um custo relativamente baixo, em comparação

com a liofilização. Secagem por spray drying produz pós granulados secos a partir de uma suspensão aquosa ou oleosa, por atomização do produto úmido em alta velocidade dentro de uma câmara (Figura 1.1). O processo de “spray drying” injeta ar em alta velocidade a temperaturas de até 200 °C. As gotículas atomizadas são, por conseguinte, dessecadas em grânulos antes de tocarem nas paredes da câmara. A temperatura de saída é a temperatura do produto à medida que deixa a câmara de secagem, a qual é relativa ao tempo de retenção dos grânulos no interior da câmara. Este processo é geralmente utilizado para produtos tais como polímeros, tensioativos, sais inorgânicos, pigmentos, produtos alimentícios como leite, soro de leite e de milho e também probióticos (CORCORAN et al., 2004; ROKKA, RANTAMAKI, 2010; GOLOWCZYC et al., 2011).

Figura 1.1 Representação esquemática da microencapsulação pelo método de *spray drying*.



Fonte: Burgain et al. (2011)

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, tais como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do material a ser encapsulado, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo.

As principais vantagens do “spray drying” é que esta tecnologia é menos dispendiosa e mais rápida para a produção de grandes



quantidades de células secas, do que outras técnicas utilizadas para preservar microrganismos (COOK et al., 2012). A principal desvantagem é que este processo resulta em exposição dos microrganismos a altas temperaturas, que pode ser prejudicial para a integridade da célula (ANAL & SINGH, 2007; ROKKA, RANTAMÄKI, 2010).

Silva et al. (2002) reportam que pequenas mudanças na temperatura de saída provocam efeitos significativos na sobrevivência de cepas de *Lactobacillus*, indicando que as temperaturas utilizadas no processo de “spray drying” devem ser otimizadas individualmente, para cada nova aplicação.

Golowczyk et al. (2011) avaliaram as propriedades probióticas “in vitro” de *Lactobacillus* isolados a partir de grãos de kefir após secagem por “spray drying”, utilizando leite em pó reconstituído como material encapsulante. As cepas de *Lactobacillus* testadas mostraram boa resistência ao processo de secagem e a sensibilidade a vários agentes que afetam a membrana citoplasmática da célula não foi modificada. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que as cepas estudadas, microencapsuladas sob as condições testadas podem ser utilizadas no desenvolvimento de potenciais pós probióticos.

Semyonov et. al (2010) concluíram que a técnica de “spray freeze drying” é um processo apropriado para gerar microcápsulas de dimensões definidas contendo *Lactobacillus paracasei* probióticas, que mantém alta viabilidade durante as etapas de atomização, congelamento e secagem.

Alguns autores relatam a sua eficiência na proteção das células probióticas. Yonekura et al. (2014) microencapsularam *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 por atomização em matrizes contendo fibra solúvel. Semyonov et al. (2011) relataram a encapsulação de *L. casei* subsp. *paracasei* LMG P-21380 em uma matriz de maltodextrina com trealose por “spray dryer” ultra-sônico a vácuo. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas produzidas mostraram uma incorporação bem sucedida das células, sugerindo que a microencapsulação por “spray drying” é eficaz para aprisionar as células viáveis, isolando-as do ambiente circundante.

De acordo com Paez et al. (2013), a microencapsulação por “spray drying” com leite em pó desnatado não afetou a viabilidade das células, no entanto, aumentou significativamente a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* A13 e *Lactobacillus casei* Nad em digestão gastrointestinal simulada (nas ordens de 0,96 e 1,95 log, respectivamente), em comparação com as culturas de células livres.

### **1.2.2 Principais agentes utilizados na microencapsulação de microrganismos probióticos**

A produção de microcápsulas estáveis para a imobilização de células microbianas inicia com a seleção de um agente encapsulante apropriado. Estudos demonstram que a natureza dos polímeros têm um papel dominante na determinação das propriedades das microcápsulas. As microcápsulas são produzidas quase que exclusivamente com a utilização de polímeros hidrossolúveis que proporcionam um elevado grau de permeabilidade de nutrientes de baixo peso molecular e metabólitos, fornecendo condições ideais para o funcionamento das células microbianas imobilizadas, sendo que polímeros hidrossolúveis sintéticos e naturais são utilizados para a microencapsulação de células microbianas (JOHN et al., 2011; RATHORE et al., 2013).

De acordo com Desai e Park (2005), um material de revestimento ideal deve apresentar as seguintes características:

- Boas propriedades reológicas em concentrações elevadas e fácil manuseio durante a encapsulação;
- Capacidade de dispersar ou emulsionar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida;
- Não reagir com o material a ser encapsulado tanto durante o processo como durante o armazenamento prolongado;
- Envolver e reter o material ativo dentro de sua estrutura durante o processo e armazenamento;
- Liberar completamente o solvente ou outros materiais usados durante a encapsulação das operações de remoção do solvente;
- Promover máxima proteção do material ativo contra condições ambientais (oxigênio, calor, luz, umidade);
- Apresentar solubilidade em solventes permitidos na indústria de alimentos;
- Baixo custo e uso permitido em alimentos.

Os polímeros mais utilizados (todos naturais, baratos, biocompatíveis e GRAS) são quitosana (obtido a partir de artrópodes), alginato (heteropolissacarídeo linear extraído de diferentes tipos de algas), carragenana, proteínas do soro, pectina, poli-L-lisina, e amido. Diferentes tipos de amido e amidos modificados têm sido testados como agentes encapsulantes de probióticos, mas em alguns casos, o baixo pH e a presença de proteases, condições comumente experimentadas por organismos probióticos durante a sua passagem através do estômago, podem diminuir sua adesão ao amido. O alginato também é amplamente utilizado para a encapsulação de bactérias lácticas

probióticas, principalmente na concentração entre 0,5 - 4 % (SHEU: MARSHALL, 1993).

Os materiais são utilizados sozinhos (monocamada) ou em combinação, sendo que neste caso, o revestimento das microcápsulas com uma película adicional pode evitar sua exposição ao oxigênio durante o armazenamento e pode melhorar a sua estabilidade em pH baixo. Por exemplo, uma das estratégias mais comuns para dupla camada (ou tripla) é representada por uma camada interior de alginato, contendo os microrganismos encapsulados, coberta por uma monocamada de quitosana que pode ser eventualmente contida numa outra camada externa de alginato, quitosana ou outros polímeros (LEE et al. 2011).

Segundo Ding e Shah (2007), a microencapsulação com alginato pode ser aplicada a diferentes cepas probióticas e, em suas pesquisas, os resultados mostram uma melhor sobrevivência a baixo pH (em torno de 2,0), concentrações elevadas de sais biliares, e ao tratamento térmico moderado de até 65 °C, quando comparados á sobrevivência de células livres. A microencapsulação pode revelar-se um importante método para melhorar a viabilidade de bactérias probióticas nos produtos alimentares ácidos e auxiliar na liberação de bactérias viáveis no trato intestinal do hospedeiro.

Picot e Lacroix (2004) utilizaram proteína de soro de leite sob a forma de concentrado ou como isolado para microencapsular probióticos. Riveros et al. (2009) utilizaram permeado de soro de leite como agente encapsulante na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por spray drying.

Levando-se em consideração o alto custo do descarte e o valor nutricional do soro de leite resultante da fabricação de queijos, é interessante a utilização do soro ou de seus componentes, sob várias formas, dentro e fora da indústria de alimentos. Maciel et al. (2014) compararam a influência de leite desnatado e soro de leite, matrizes lácteas com diferentes conteúdos de lactose e proteína e diferentes perfis proteicos no rendimento da encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5, a resistência do probiótico à condições gastrointestinais simuladas, e sua viabilidade durante 90 dias de armazenagem a 4 e 25 °C.

Schell and Berman (2014) utilizaram soro de leite e goma-laca como materiais de revestimento na microencapsulação de *L. reuteri* DSM 20016 utilizando a tecnologia de leite fluidizado a fim de estabelecer uma formulação ácido resistente para alimentos probióticos visando liberação controlada das bactérias encapsuladas. Os autores concluíram que a tecnologia de leite fluidizado com uma combinação de

soro de leite e goma-laca como material de encapsulamento ofereceu resistência a ácidos para *L. reuteri* DSM 20016 e permitiu uma melhor sobrevivência durante o trânsito gastro-intestinal.

A utilização de soro de leite na sua forma líquida foi estudada por Pimentel-Gonzalez et al. (2009), que utilizaram concentrado de soro de leite como um agente emulsionante para a microencapsulação de microrganismos probióticos por emulsificação. Nesse caso, o soro mostrou-se ser um agente emulsificante eficiente, sendo que os probióticos microencapsulados apresentaram maior resistência às condições gastrointestinais simuladas, possivelmente devido ao poder tamponante do soro.

De Castro-Cislaghi et al.(2012) utilizaram de soro de leite líquido como agente encapsulante de microrganismos probióticos através de “spray drying”. Nesse estudo os autores concluíram que soro de leite é um agente promissor para a utilização como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por “spray drying”.

Segundo Cook et al. (2012), a microencapsulação tem o potencial de ser uma ferramenta útil para melhorar a sobrevivência dos probióticos ao longo do trato digestório, quer em sistemas baseados em polissacarídeos ou proteínas. No entanto, ainda há espaço para melhorias em termos de sobrevivência bacteriana em pH baixo, assim como para pesquisas mais centradas no controle da liberação dos microrganismos a partir das cápsulas.

Dentre todos esses materiais, o leite em pó tem mostrado ser o que fornece maior proteção da viabilidade celular durante o processo de “spray drying” (FU & CHEN, 2011; GARCÍA, 2011).

### 1.3 ENUMERAÇÃO DE LACTOBACIOS EM PRODUTO LÁCTEO

Atualmente, apesar de seu impacto econômico, a maior parte dos ensaios que são utilizados para identificar e quantificar os lactobacilos são métodos microbiológicos clássicos, que são em geral, demorados, difíceis de padronizar e por vezes, sujeitos a erros (HERBEL et al., 2013). Convencionalmente, a diferenciação de lactobacilos inclui análise da morfologia, coloração de Gram e ensaios bioquímicos, como a fermentação de carboidratos, e também o crescimento a diferentes temperaturas e concentrações de sal (HERBEL et al., 2013). Os lactobacilos são frequentemente difíceis de serem diferenciados por meio de técnicas microbiológicas clássicas já que a maioria deles têm necessidades nutricionais e de crescimento semelhantes (KAO et al., 2007; POLTRONIERI et al., 2008).

Geralmente os produtos lácteos, como iogurte e queijo, possuem uma população de várias espécies de bactérias lácticas intimamente relacionadas, nesses casos, a presença simultânea de várias espécies (cultivos iniciadores e bactérias probióticas) que compartilham características de cultivo semelhantes, num mesmo produto, pode dificultar a contagem diferencial de cada espécie em separado (ASHRAF, R.; SHAH, 2011).

O meio LC (*Lactobacillus casei*) tem sido proposto para o isolamento seletivo de *L. casei* em iogurtes e bebidas lácteas fermentadas (Ravula & Shah, 1998). A seletividade baseia-se na inibição de *S. thermophilus*, ajustando o pH do meio a 5,1 e na incapacidade de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de fermentar ribose. Van de Castele e colaboradores (2006) avaliaram a adequação de meios de cultura já descritos na literatura quanto à seletividade na enumeração de 10 linhagens comerciais de BAL probióticas (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* em combinação com cultivos iniciadores comerciais para iogurte e queijo. Os autores relataram que MRS- AC (MRS+ácido acético) e NA-salicina (Ágar nutriente + salicina) foram considerados apropriados para o isolamento seletivo de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* respectivamente, entretanto, constataram que o meio MRS-AC também permitiu o crescimento de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentes no fermento comercial Yomix VM1-36 utilizado como iniciador na produção de iogurte.

Métodos independentes de cultivo vêm sendo reconhecidos como uma valiosa alternativa para métodos tradicionais de cultivo (AGRIMONTI et al 2013;. DE MEDICI et al 2014; RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2014). Estes métodos podem basear-se na análise direta do DNA extraídos da matriz alimentar (ACHILLEOS e BERTHIER 2013; RODRÍGUEZ et al., 2012). A fim de quantificar a presença de certos microrganismos por técnicas baseadas em DNA, a quantidade de DNA genômico deve ser correlacionada com a quantidade de biomassa. No entanto, a natureza não linear da amplificação por PCR torna difícil relacionar a quantidade final de sequências com a quantidade inicial de DNA genômico em uma amostra (JUSTÉ et al., 2008). Desta forma, a quantificação precisa de DNA pode ser realizada utilizando PCR em tempo real (HEID et al., 1996).

A PCR não é capaz de distinguir entre DNA oriundo de células mortas do DNA pertencente a células viáveis, uma vez que, após a morte celular, o DNA pode permanecer íntegro no ambiente

(JOSEPHSON et al., 1993; WOLFFS et al., 2005; LIANG et al., 2011). Desta forma, métodos moleculares baseados na detecção de DNA tendem a superestimar a presença de células viáveis.

A fim de monitorar bactérias lácticas em produtos lácteos, métodos moleculares, baseados na amplificação do DNA bacteriano por PCR em tempo real (qPCR) foram desenvolvidos com sucesso para *L.acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. reuteri* em iogurte (HERBEL et al. 2013) e para *S. thermophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L.paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* em outros produtos lácteos fermentados (FURET et al., 2004).

Comparado com PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) permite uma detecção “on line” do produto da PCR, evitando a necessidade de processamento pós-PCR. A qPCR ocorre em ambiente fechado e acelera o processo de quantificação de DNA, além de reduzir a chance de contaminação cruzada (HERNANDEZ et al., 2005; HOLST-JENSEN et al., 2003).

Em microbiologia de alimentos, PCR em tempo real tem sido utilizada para detectar e quantificar os organismos-alvo específicos (RAJKOVIC et al., 2006; MARTIN et al., 2006; NORDSTROM et al., 2007). Vários pares de iniciadores espécie-específicos foram desenvolvidos com base na variabilidade de seqüências 16S rRNA para diferenciar cinco cepas de lactobacilos que foram adicionadas a produtos probióticos em Taiwan (KAO et al., 2007). Iniciadores espécie-específicos identificaram facilmente *L. acidophilus* e *L. delbrueckii*, mas não puderam ser utilizados para distinguir *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (KAO et al., 2007).

Recentemente, um ensaio de PCR em tempo real para quantificar *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei* em queijo foi desenvolvido tendo como gene alvo o fator de alongação - gene *tuf* (ACHILLEOS E BERTHIER 2013).

Chavagnat et al. (2002) propuseram este gene (*tuf*) como um alvo interessante para a detecção de seqüências muito intimamente relacionadas de lactobacilos, uma vez que o gene *tuf* é ligeiramente menos conservado do que o gene rRNA 16S neste gênero. Contudo, os iniciadores devem ser devidamente projetados e / ou a amplificação por PCR deve ser seletiva o suficiente para evitar a amplificação de espécies relacionadas. O fator de alongação mostrou ser altamente variável entre bactérias produtoras de ácido láctico, especialmente entre espécies intimamente relacionadas, tais como as do grupo *L.casei* (CHAVAGNAT et al 2002; YU et al 2012).

## 1.4 REFERÊNCIAS

ACHILLEOS, C., BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology** v. 36, n. 2, p. 286-295, 2013.

AGRIMONTI, C. et al. A Real-Time PCR/SYBR Green I Method for the Rapid Quantification of *Salmonella enterica* in Poultry Meat. **Food Analytical Methods** v. 6, n. 4, p. 1004-1015, 2013.

ALLEN, S. J. et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhea. **São Paulo medical journal**, v.129, n. 3, p. 185 -185, 2011.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**. v. 18, p. 240-251, 2007.

ANUKAM, K.,C. and REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.)**, p. 466-474, 2007.

APLEVICZ, K. S. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the brazilian grape sourdough. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, n. 2, p. 321–327, 2014.

ARGYRI, A. A. et al.. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v. 33, p. 282-291, 2013.

ARICI, M. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiology**, v. 21, n.1, p. 19-24, 2004.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **International Journal of Food Microbiology** v. 149, p. 194-208, 2011.

ATANASSOVA, M. et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International Journal of Food Microbiology** v. 87, p. 63–73, 2003.

BENDALI, F. et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: an Algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. **Journal of Food and Nutrition Research** v. 50, n. 3, p. 139–149, 2011.

BENDJEDDOU, K. et al. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 1543–1552, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 25 junho 2012. 2008

BURGIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467–483, 2011.

BURITI, F. C. A., CARDARELLI, H. R., SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 228–235, 2007.

BURITI, F. C. A., CASTRO, I. A., SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121–129, 2010.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time - RTPCR- a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005.



CHAVAGNAT, F. et al. Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 177 - 183, 2002.

CHIANG, SHEN-SHIH and PAN, TZU-MING. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 903-916, 2012.

CORCORAN, B.M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering** v.113, n. 2, p. 186-193, 2012

DE MACEDO, R., E. Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado. Curitiba, 2005. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná.

DE MEDICI, D. et al. Rapid Methods for Quality Assurance of Foods: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. **Food Analytical Methods**: 1-17, doi:10.1007/s12161-014-9915-6, 2014

DE VRESE, M., SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** v. 111, p.1 – 66, 2008.

DE VUYST, L., LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. **Journal of Molecular and Microbiological Biotechnology**, v. 13, p.194–199, 2007.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DESMOND, C. et al. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 1003–1011, 2002.

DING, W.K. and SHAH, N.P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M446-M450, 2007.

EIJSSINK, V. G. H. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 81, p. 639 – 654, 2002.

FALAGAS, M. E., BETSI, G. I., ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clinical Microbiology and Infection** , v.13, p. 657– 664, 2007.

FAO/WHO. **Probióticos en los alimentos**. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, 2006. 45 p. Disponível em: <FTP://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a512s00pdf>. Acesso em 11 de junho de 2013.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La- 05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 485-494, 2002.

FRANZ, C. M.A.P. et al. African fermented foods and probiotics. **International journal of food microbiology**, n. 190, p. 84 -96, 2014.

FU, N., CHEN, D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v. 44, p. 1127–1149, 2011.

FURET, J. P., QUENEE, P., TAILLIEZ, P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** v. 97, n. 2, p.197-207, 2004.

GARCIA, A. H. Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. **Journal of Biosciences**, v. 36, p. 939–950, 2011.

GARDINER, G.E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.6, p. 2605–2612, 2000.

GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology, **Research in Microbiology**, v.161, p. 480 - 487, 2010.

GOLOWCZYC, M. A. et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, p. 556-560, 2011.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 591-600, 2012.

HAJELA, N. ; NAIR, G. B ; GANGULY, N. K. Are probiotics a feasible intervention for prevention of diarrhoea in the developing world? **Gut Pathogens**, v. 2, p. 10, 2010.

HASSAN, Y. I. AND BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 112-115, 2008.

HEID, C. A. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HEIDEBACH, T., FORST, P., KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications: Critical Review. **Food Science and Nutrition**, v. 52 p. 291-311, 2012.

HERBEL, S. R. et al. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology** v. 115, n. 6, p. 1402-1410, 2013.

HERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FERRANDO, A. Current methodology for detection, identification and quantification of

genetically modified organisms. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 203-221, 2005.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 985-993, 2003.

JOHN, R.P., TYAGI, R.D., BRAR, S.K., SURAMPALLI, R.Y., PREVOST, D., Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology** v. 31, p. 211–226, 2011.

JOSEPHSON, K.L., GERBA, C.P, PEPPER, I.L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology** v. 59, p. 3513-3515, 1993.

JUSTE', B.P.H.J. THOMMA, B. LIEVENS Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology** v. 25, p. 745-761, 2008.

KAILASAPATHY, K., MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 252-258, 2005.

KAO, Y. T., LIU, Y. S., SHYU, Y. T. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International** v. 40, n. 1, p. 71-79, 2007.

KRISTO, E., BILIADERIS, C. G., TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 7, 517-528, 2003.

LAVERMICOCCA, P. et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p. 4084-4090, 2000.

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J. AND DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action.

**Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.4, p. 728-764, 2008.

LEE, H. et al. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**. v. 145, p. 155-161, 2011.

LEROY, F. and DE VUYST, L., Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends Food Science and Technology**, v. 15, p: 67-78 2004.

LIAN, W.-C.; HSIAO, H.-C.; CHOU, C.-C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p.293–301, 2003.

LIANG N, DONG J, LUO L, YONG L. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. **Journal of Food Science**, v. 76, p. M234-M237, 2011.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1991-1998, 2014.

MARTIN, B. et al. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 6040-6048, 2006.

MESSENS, W., DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 31-43, 2002.

MEURMAN, J. H., STAMATOVA, I. Probiotics: contributions to oral health. **Oral Diseases**, v.13, p. 443-451, 2007.

MINOCHA A., Probiotics for Preventive Health. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 24, n. 2, 2009.

MORTAZAVIAN, A. et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2007.

MURUGESAN, R., ORSAT, V. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review. **Food Bioprocess Technology** v.5, p. 3-14, 2012.

NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion In Biotechnology**, v.23, p.182–186, 2012.

NORDSTROM, J.L. et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5840-5847, 2007.

PAÉZ , R. et al. Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. **International journal of dairy technology** v. 66, n.2, p. 155-161, 2013.

PAEZ, R. et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International** v. 48, p.748-754, 2012.

PAROLO, C.C.F. et al. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p. 105-113, 2011.

PATEL, S.; MAJUMDER, A.; GOYAL, A. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n.1, p. 3-12, 2012.

PATRIGNANI, F. et al. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **International Journal of Food Microbiology**. v.107, p. 1- 11. 2006.

PERES,C. M. et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria e With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science andTechnology** v. 26, p. 31-42, 2012.

PICOT, A., LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal

conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505-515, 2004.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J. et al. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International** v. 42, p. 292–297, 2009.

PINTO, M.G.V. et al. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109, p. 205–214, 2006.

POLTRONIERI, P. et al. DNA Arrays and Membrane Hybridization Methods for Screening of Six *Lactobacillus* Species Common in Food Products. **Food Analytical Methods**, v. 1, n. 3, p. 171-180, 2008.

PRAKASH, S., C. et al. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. **Journal of Biomedical Biotechnology**. 2011. Article ID 981214, 12 p.[doi:10.1155/2011/981214](https://doi.org/10.1155/2011/981214)2011.

RAJKOVIC, A. et al. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in Foods. **Applied Environmental Microbiology**. 72, 6593–6599, 2006

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, V. 116, p. 369–381, 2013.

RAVULA, R. R., SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 11, p. 819-822, 1998.

RIVEROS, B.; FERRER, L.; BÓRQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus*. **Drying Technology**. v. 57, p. 123-132. 2009.

RODRÍGUEZ, A. et al. Development of Two Quantitative Real-Time PCR Methods Based on SYBR Green and TaqMan to Quantify Sterigmatocystin-Producing Molds in Foods. **Food Analytical Methods**, v.5 n. 6, p. 1514-1525, 2012.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E. et al. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of agumiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299-1306, 2007.

RODRIGUEZ-LAZARO D. et al. Application of the SureTect Detection Methods for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in **Meat, Dairy, Fish, and Vegetable Products**. Food Analytical Methods, 2014:1-6. doi:10.1007/s12161-014-9970-z

ROKKA, S., RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research Technology** v. 231, p. 1–12, 2010.

ROOS, S., JONSSON, H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucous components. **Microbiology**, v.148, p. 433-442, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAAD, S. M. I., KOMATSU, T. R., GRANATO, D., BRANCO, G. F., BURITI, F. C. A. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Aspectos Tecnológicos, Legislação e Segurança no Uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. p. 23-49.

SHELL, D., BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival **Food Research International**, v. 62, p.308-314, 2014.

SCHNÜRER, J., MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.

SEMYONOV, D. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International** v. 43,p. 193–202, 2010.



SEMYONOV, D., RAMON, O., SHIMONI, E. Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. **LWT-Food Science and Technology** v. 44, p. 1844–1852, 2011.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 28, p. 405-440, 2004.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p.1262-1277, 2007.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 557–561, 1993.

SILVA, J. et al. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 77-81, 2002.

SOCCOL, C. R. et al. The potential of probiotics, **Food Technology and Biotechnology**, v.48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOLIS, B. et al. Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhoea. **European journal of clinical nutrition**, v.56, n.3, p. S57 -S59, 2002.

STOYANOVA, L. G., USTYUGOVA, E. A. AND NETRUSOV, A. I., Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 229–243, 2012.

SUSKOVIC, J. et al. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter Lactic Acid Bacteria. **Food technology and biotechnology**, v. 48, n.3, p. 296 – 307, 2010.

THI, L. N., CHAMPAGNE, C.P., LEE, B.H., GOULET, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 67– 75, 2003.

TODOROV S. D., DICKS L.M.T. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on

physiological properties. **Annals of Microbiology**. v. 58 p.661–670, 2008.

TODOROV, S. D., Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 209-221, 2009.

TUO, Y., ZHANG, W., ZHANG, L., AI, L., ZHANG, Y., HAN, X., YI, H. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains, **Anaerobe**, v.21, p. 22-27, 2013.

VALERIO, F. et al. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3042–3045, 2006.

VAN DE CASTEELE, S. et al. . Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1470-1476, 2006.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714– 728, 2008.

VINDEROLA, G., PROSELLO, W., MOLINARI, F., GHIBERTO, D., REINHEIMER, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 171–174, 2009.

VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v.36, p. 895–904, 2003.

WOLFFS P, NORLING B, RADSTROM P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 315-323, 2005.

YONEKURA, L., SUN, H., SOUKOULIS, C., FISK, I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion **Journal of Functional Foods** v.6, p. 205–214, 2014.

YU, J., SUN, Z., LIU, W., BAO, Q., ZHANG, J., ZHANG, H. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial hsp60, pheS and tuf gene sequences. **European Food Research and Technology** v. 234, n. 6, p. 927-934, 2012.

## CAPÍTULO 2

### 2 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DE *L. paracasei* FNU

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversas pesquisas têm sido realizadas a respeito da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias ácido lácticas (BAL). Tais substâncias pertencem a diferentes classes de compostos orgânicos e são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Alguns desses metabólitos, particularmente bacteriocinas (nisina), vem sendo utilizados com sucesso na indústria visando um aumento na vida de prateleira de produtos alimentares. No entanto, a procura de novas substâncias antimicrobianas é crescente na indústria alimentar (STOYANOVA et al., 2012).

No conceito de alimentos funcionais, especialmente na indústria de laticínios, existe um interesse crescente em produtos probióticos que contenham BAL. Cepas de BAL probióticas devem ser escolhidas de acordo com critérios de seleção de modo a sobreviver à passagem através do trato digestório e, preferivelmente, colonizarem o trato intestinal durante um período suficientemente longo para atingir o efeito benéfico desejado. Uma das propriedades mais importantes dos probióticos é a proteção contra agentes patogênicos no trato intestinal do hospedeiro (SUSKOVIC et al., 2010). O mecanismo através do qual os probióticos podem antagonizar patógenos envolve a produção de compostos antimicrobianos, tais como ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (PINTO et al., 2006).

Vários estudos têm demonstrado atividade antimicrobiana exercida por lactobacilos e bifidobactérias contra agentes microbianos patogênicos que agem no trato digestório humano (SERVIN, 2004). Os mecanismos desse efeito antimicrobiano dos probióticos são em grande parte desconhecidos, mas é provável que sejam resultado de vários fatores, incluindo a redução de pH luminal, a competição por fontes de nutrientes, a inibição da adesão a células epiteliais, a estimulação do sistema imune do hospedeiro e a produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas ou substâncias tipo bacteriocina (MUÑOZ-QUEZADA et al., 2013).

BAL isoladas de fermento natural produzem diferentes substâncias inibidoras além de ácidos orgânicos, algumas dessas

substâncias são ativas contra cepas de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* (MESSENS & DE VUYST, 2002), leveduras (ATASSANOVA, 2003), e contra bolores, como *Fusarium proliferatum* e *Fusarium graminearum* (HASSAN; BULLERMAN, 2008). De acordo com Leeber et al. (2008), o ácido láctico pode ser considerado o composto chave produzido por lactobacilos, no que se refere à ação antimicrobiana. De Keersmaecker et al (2004) demonstraram que a atividade antimicrobiana de *L. rhamnosus* GG contra *S. enterica* sorovar *typhimurium* foi devido à acumulação de ácido láctico.

Muitos lactobacilos são relatados como produtores de peptídeos antimicrobianos chamados de bacteriocinas. Essas bacteriocinas são geralmente ativas contra espécies estreitamente relacionadas, que provavelmente residem no mesmo nicho ecológico. A maioria das bacteriocinas de *Lactobacillus* são proteínas de baixo peso molecular, estáveis ao calor, com um ponto isoelétrico elevado (bacteriocinas de classe II) que atuam geralmente através da indução de permeabilização da membrana bacteriana e o subsequente vazamento de moléculas (EIJSSINK et al., 2002).

Este estudo avaliou a capacidade de *L. paracasei* FNU em inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* subsp.*enterica* sorovar. *typhimurium* (ATCC 14028) “in vitro”.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Microrganismos

Para a verificação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Lactobacillus paracasei* FNU, isolado de fermento natural de uva, previamente identificado por suas características fenotípicas e genéticas (APLEVICZ et al, 2014) mantida em Ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharp, Difco, Sparks, MD, EUA), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 (mantidas em Ágar BHI - Brain Heart Infusion, OXOID), *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 25922 mantidas em Ágar Nutriente (MERCK) e *Salmonella enterica* subsp.*enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028 mantida em Ágar TSA (Trypticase Soy Agar – OXOID).

## 2.2.2 Produção de substâncias antimicrobianas

Foram efetuados testes para a verificação de alguma atividade inibitória da cepa em estudo utilizando-se, para isso, o método de camada tripla conforme Todorov e Dicks (2006). Uma alçada da cultura estoque de *Lactobacillus paracasei* FNU foi inoculada em 10 mL de caldo MRS, incubada a 30 ° C durante 24 horas. Em seguida, procedeu-se às diluições decimais do caldo com crescimento e inoculação em profundidade em ágar MRS, com sobrecamada, seguida de incubação a 30 ° C por 48 horas. As culturas testes Gram negativa e Gram positiva (*E. coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, repectivamente) foram inoculadas em Agar BHI semi-sólido (BHI contendo 0,75% de Agar) na concentração de  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL e então, este Ágar foi vertido sobre as placas com crescimento de *L. paracasei* FNU. As placas com a sobrecamada de Agar semissólido foram incubadas a 37 ° C por 48 horas. Verificada a inibição no crescimento das bactérias patogênicas testadas, foi então realizada a verificação da atividade inibitória do sobrenadante contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* subsp.*enterica* sorovar. *typhimurium* (ATCC 14028) “in vitro”.

## 2.2.3 Verificação da atividade antibacteriana do sobrenadante

Para a detecção da atividade do sobrenadante, dois frascos com 100 mL de caldo MRS foram inoculados com 10 mL de uma pré-cultura (18h) de *Lactobacillus paracasei* FNU contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL e incubados a 30 ° C durante 16 h, sendo que um dos frascos permaneceu em incubadora sob agitação e o outro em cultivo estático em estufa. Após a incubação, as células foram removidas por centrifugação a 4000 rpm durante 30 min a 4 ° C (centrífuga refrigerada Nova Técnica NT825). Para cada cultivo, os sobrenadantes livres de células foram divididos em duas alíquotas, uma das quais teve o pH ajustado para próximo da neutralidade (6,0 – 6,2) com a adição de NaOH 1 N e em seguida, esses sobrenadantes foram esterilizados por filtração em filtros de nylon, poro de 0,22 µm (Corning 25934-200, Corning, New York, EUA). A atividade antibacteriana dos sobrenadantes livres de células foi testada contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar. *typhimurium* ATCC 14028

através do ensaio de difusão em poços, como descrito por Cintas et al. (1995) com algumas modificações (BENDJEDDOU et. al., 2012). Resumidamente, foram inoculados, em profundidade, 1 mL de cada cultura teste com cerca de  $10^8$  UFC/mL (Mc Farland 0,5) em meio agar apropriado (BHI, TSA, Ágar nutriente). Após solidificação do meio, foram preparados, de maneira estéril, poços com 6 mm de diâmetro. Em seguida, 50 µl do sobrenadante foram vertidos em cada poço. As placas foram pré-incubadas a 4 °C por 2 horas para permitir a difusão total do sobrenadante, e, em seguida, incubadas a 37 °C durante 24 horas. A atividade antibacteriana foi avaliada pela verificação da formação de zonas de inibição (halos) em torno dos poços, os quais tiveram seus diâmetros medidos com o auxílio de paquímetro digital (Digital Caliper 0-150 mm, China) e expressos em mm.

#### 2.2.4 Verificação da natureza proteica da substância ativa

A natureza proteica da substância antimicrobiana produzida por *L. paracasei* foi verificada pelo tratamento com as seguintes enzimas: tripsina de pâncreas bovino (Merck) 40 U / mg, condições ótimas: pH 8 a 25 °C; pronase E (Merck) 70000 PUK /g, condições ótimas: pH 7,4 a 40 °C; protease tipo IV de *Streptomyces caespitosus* (Sigma), 0,7 U / mg, condições ótimas: pH 7,5 a 37 °C) como descrito por Atanassova et al. (2003) com modificações. As soluções preparadas com 100 µL do sobrenadante/100 µL de solução tamponada de enzima (concentração final de 1%) foram mantidas a temperatura ótima de cada enzima por 1 hora, em seguida, a 97 °C durante 3 minutos para a inativação enzimática. A mistura foi resfriada até temperatura ambiente e submetida ao teste de antagonismo em poços como descrito em 2.2.3 contra os microrganismos que sofreram inibição com o sobrenadante a pH 6,0.

O tratamento enzimático da substância ativa foi realizado juntamente com os seguintes controles:

- (a) Sobrenadante (pH 6,0) sem tratamento enzimático mas aquecido a 97 °C durante 3 minutos;
- (b) Sobrenadante (pH 6,0) sem tratamento enzimático e sem aquecimento e
- (c) Água destilada estéril.

O não aparecimento de zona de inibição ao redor dos poços indicou a sensibilidade da substância antimicrobiana à enzima adicionada, demonstrando a natureza proteica da mesma.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

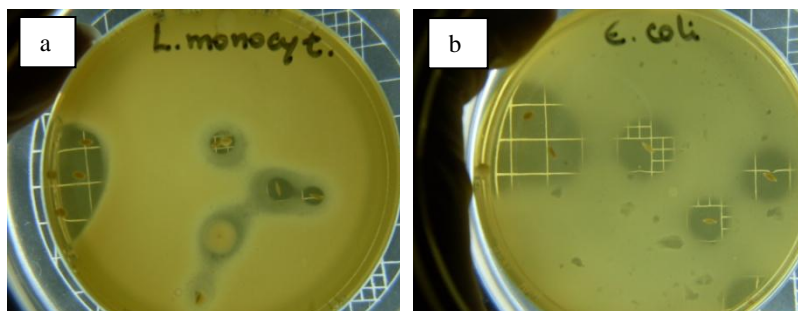
## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Produção de substâncias antimicrobianas

Para verificar a produção de substâncias antimicrobianas pela cepa de *L. paracasei* FNU foi feito um ensaio preliminar utilizando o método de camada tripla contra duas cepas patogênicas.

Na figura 2.1 observa-se a formação de zonas de inibição ao redor de colônias de *L. paracasei* FNU inibindo o crescimento de uma cepa Gram positiva (*L. monocytogenes*) e uma Gram negativa (*E. coli*), indicando que houve produção de metabólitos antimicrobianos que se difundiram no meio de cultivo durante o crescimento a 30 °C pelo período de 48 horas.

Figura 2.1: Inibição produzida por *L. paracasei* FNU, no método de camada tripla contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 (a) e *E. coli* ATCC 25922 (b)



O ácido lático e o ácido acético são os principais metabólitos formados por BAL durante a fermentação. Quando comparado com o ácido lático, o ácido acético tem um espectro mais amplo de atividade antimicrobiana. Ao mesmo tempo, sabe-se que existe um efeito sinérgico entre ambos os ácidos: misturas de ácido lático e ácido acético suprimem o crescimento de patógenos Gram negativos como *Salmonella typhimurium*. Os microrganismos reagem de forma diferente à acidez do ambiente. A pH abaixo de 5,0, o ácido lático inibe crescimento bactérias formadoras de esporos, mas não afeta o crescimento de fungos e leveduras microscópicas (STOYANOVA; USTYUGOVA; NETRUSOV, 2011). Segundo Brink et al. (2006), o papel de bacteriocinas e a sua importância no controle da proliferação de bactérias patogênicas no trato intestinal é questionável. No entanto, a



partir de relatos científicos sobre bacteriocinas ativas contra bactérias gram-negativas (TODOROV e DICKS, 2004), houve um renovado interesse por esses peptídeos e sua interação com patógenos intestinais.

### 2.3.2 Verificação da atividade antibacteriana do sobrenadante

Diversos autores relataram a capacidade de algumas cepas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* de diferentes nichos ecológicos, de produzir compostos antibacterianos com um amplo espectro de atividade (ATANASSOVA et al 2003, LOZO et al., 2007, VERDENELLI et al., 2009, TOLINACKI et al., 2010, BENDJEDDOU et al., 2012).

Atividade contra bactérias Gram-negativas não é muito comum e é relatada para poucas bactérias lácticas. Entretanto, um número crescente de compostos antimicrobianos de largo espectro já foram descritos (BRINK et al., 2006).

Na tabela 2.1 observa-se a atividade antimicrobiana dos sobrenadantes obtidos de *L. paracasei* FNU cultivado sob agitação e em cultivo estático. Os sobrenadantes foram testados em pH  $6,0 \pm 0,2$  (visando descartar a atividade de ácidos) e pH  $4,0 \pm 0,2$ .

*Escherichia coli* ATCC 25922 foi inibida pelos sobrenadantes dos dois cultivos (aerado e estático), sendo que os maiores halos foram observados em pH 4,0, o que sugere a ação de ácidos inibindo o crescimento do patógeno. O sobrenadante com pH 6,0 proveniente do cultivo estático não inibiu o patógeno. Abbasiliasi et al. (2011) observou que não houve diferença significativa no crescimento e produção de substância tipo bacteriocina (BLIS) por *L. paracasei* LA07, isolado de produto fermentado de peixe, com diferentes taxas de agitação em cultivos sob condições aeróbicas e anaeróbicas.

Os maiores halos de inibição foram observados para *B. subtilis* ATCC 6051, um resultado esperado por ser este um microrganismo que provoca defeitos em pães e a cepa de *L. paracasei* em estudo ter sido isolada de fermento natural proveniente de uma mistura de uvas e farinha de trigo.

*Staphylococcus aureus* foi inibido com sobrenadante obtido de cultivo estático, a pH 4,0. *Listeria monocytogenes* sofreu inibição com ambos os sobrenadantes sendo que os maiores halos de inibição foram notados em pH 4,0.

Tabela 2.1 Atividade antimicrobiana de *L. paracasei* FNU contra A: *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, D: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, E: *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028.

Microorganismo teste	<i>L. paracasei</i> FNU – Cultivo sob agitação		<i>L. paracasei</i> FNU – Cultivo estático		Controle Água estéril
	Sobrenadante pH 6,0±0,2	Sobrenadante pH 4,0±0,2	Sobrenadante pH 6,0±0,2	Sobrenadante pH 4,0 ±0,2	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2593,	-	-	-	10	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9	13	-	12	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	10	14	9	16	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10	13	10	14	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> sorovar. <i>typhimurium</i> ATCC 14028	-	10	-	-	-

- sem inibição

Os números representam o diâmetro do halo em mm.

Quando o pH do sobrenadante foi elevado para 6,0 observou-se uma inativação da substância inibidora contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 e *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028, não influenciando o tipo de cultivo (aerado ou estático), indicando que nestes casos, a produção de ácidos a partir da fermentação de *L. paracasei* FNU, parece ter sido o fator chave no potencial inibidor. O modo exato de ação subjacente a este efeito antimicrobiano do ácido láctico ainda não foi completamente esclarecido, embora seja claro que tanto o crescimento de *Salmonella* quanto a expressão de fatores de virulência são afetadas pelo ácido láctico (DURANT et al., 2000). Além de exercer a sua atividade através da redução do pH e através da sua forma não dissociada, o ácido láctico é também conhecido como um agente permeabilizante da membrana externa dos microrganismos gram-negativos (ALAKOMI et al., 2000), permitindo que outros compostos possam atuar de forma sinérgica com o ácido láctico.

*L. paracasei* M3 isolado de queijo amarelo búlgaro mostrou atividade inibidora contra espécies estreitamente relacionadas de BAL como *L. delbrueckii*, contra *B. subtilis* e *H. pylori*, e contra várias espécies de *Candida* (ATASSANOVA et al, 2003). Huttunen et al. (1995) descreveram a atividade inibidora de duas cepas de *L. casei* contra diversas cepas de *B. subtilis*.

### **2.3.3 Verificação da natureza proteica da substância inibidora**

Os testes para verificação da natureza proteica do sobrenadante foram realizados com os microrganismos que sofreram inibição com o sobrenadante a um pH 6,0. Desta forma, *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 e *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar. *typhimurium* ATCC 14028 não foram testados já que foram inibidos apenas pelo sobrenadante em pH 4,0.

A tabela 2.2 apresenta os resultados obtidos após o tratamento do sobrenadante com enzimas proteolíticas.

Tabela 2.2: Sensibilidade do sobrenadante com atividade antimicrobiana à enzimas proteolíticas

Tratamento	pH 6,0 + aquecimento	Ph 6,0	Químio tripsina	Protease	Pronase	Controle (Água estéril)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	++	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	+	-	-	-	-

- diâmetro do halo < 10 mm , + diâmetro de até 10 mm, ++ diâmetro entre 10 e 15 mm

A natureza proteica dos compostos inibidores presentes no sobrenadante foi confirmada no teste com enzimas proteolíticas, entretanto o tratamento térmico do sobrenadante com pH 6,0 inibiu a ação desses compostos.

Peróxido de hidrogênio pode agir como inibidor de *L. monocytogenes* (SIP et al., 2012). Esta possibilidade não pode ser descartada neste estudo devido ao fato de não ter sido realizado o tratamento do sobrenadante com peroxidase.

## 2.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste ensaio de detecção de atividade antimicrobiana sugerem que o sobrenadante proveniente do cultivo de *L. paracasei* FNU contém substâncias antimicrobianas com um amplo espectro de atividade que pode afetar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Tendo em vista que houve inibição de todos os microrganismos testados, com o sobrenadante a pH 4,0 ou a pH 6,0, em maior ou menor intensidade, pode-se afirmar que o efeito inibitório não foi causado apenas pela ação de ácidos orgânicos. Verificou-se inibição da substância antimicrobiana quando tratada com enzimas proteolíticas, sugerindo a ação de uma substância tipo bacteriocina (BLIS). Entretanto, a inibição produzida pelo sobrenadante também pode ser proveniente de produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela bactéria, tendo em vista que esta hipótese não foi descartada pela utilização de peroxidase.

A capacidade de produzir substâncias inibidoras demonstra que o isolamento e caracterização de *L. paracasei* FNU é importante no que se refere à busca por cepas que possam ser utilizadas como probióticos na indústria de alimentos, devendo-se, entretanto, realizar estudos futuros com um espectro maior de microrganismos.

## 2.5 REFERÊNCIAS

ABBASILIASI, S. Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (blis) by lactobacillus paracasei LA07, a strain isolated from budu **Biotechnology & Biotechnology Equipment**. v. 25, n. 4, p. 2652-2657, 2011.

ALAKOMI, H. L. et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2001–2005, 2000.

APLEVICZ, K. S. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences** v.50, n. 2, p. 321–327, 2014.

ATANASSOVA, M. et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International Journal of Food Microbiology** v.87, p.63–73, 2003.

BENDJEDDOU, K. et al. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 1543–1552, 2012.

BRINK, M. et al. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.813–820, 2006.

CINTAS, L. M. et al. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n.7, p. 2643 – 2648, 1995.

DE KEERSMAECKER, S. C. J. et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiology Letters** v. 259, p. 89–96, 2006.

DURANT, J. A., CORRIER, D. E., RICKE, S. C. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hlaA* and *invF* genes of *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 573–578, 2000.

EIJSSINK, V. G. H. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 639–654, 2002.

HASSAN, Y. I., BULLERMAN, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread

culture **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 112–115, 2008.

HUTTUNEN, E., NORO, K., YANG, Z. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. **International Dairy Journal** v. 5, p. 503–513, 1995.

ILHA, E. et al. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology** doi:10.1007/s00217-014-2402-x, 2014.

LEBEER, S., JOS VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n.4, p. 728–764, 2008.

LOZO, J. et al. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2–8, a natural isolate from homemade cheese. **Current Microbiology**, v. 55, p. 266–271, 2007.

MESSENS, W., DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology** v. 72, p. 31–43, 2002.

MUÑOZ-QUEZADA, S. et al. Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. **British Journal of Nutrition**, v.109, p. S63–S69, 2013.

PINTO, M.G.V. et al. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109, p. 205–214, 2006.

SERVIN A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405–440, 2004.

STOYANOVA, L. G.; USTYUGOVA, E. A.; NETRUSOV, A. I. Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties. **Applied Biochemistry and Microbiology** v. 48, n. 3, 2012.

TOLINACKI, M. et al. Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, p. 889–899, 2010.

VERDENELLI, M. C. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. **European Journal of Nutrition** v. 10, p.345–353, 2009.

SIP, A. et al. Anti-Listerial activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland, **Food Control** v. 26, p. 117 - 124, 2012.

SUSKOVIC, J. et al. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter Lactic Acid Bacteria. **Food technology and biotechnology**, v. 48, n.3, p. 296 – 307, 2010.

TODOROV S. D., DICKS L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 11–19, 2006.





## CAPÍTULO 3

Artigo publicado no periódico “European Food Research and Technology”, volume 240, número 5, páginas 977 – 984, 2015. DOI 10.1007/s00217-014-2402-x

### **3 *Lactobacillus paracasei* ISOLATED FROM GRAPE SOURDOUGH: ACID, BILE, SALT, AND HEAT TOLERANCE AFTER SPRAY DRYING WITH SKIM MILK AND CHEESE WHEY**

Eunice Cassanego Ilha; Tiago da Silva; Juliana Goulart Lorenz; Gabriela de Oliveira Rocha; Ernani S. Sant’Anna

#### **Resumo**

Bactérias lácticas têm sido isoladas a partir de fermento e podem apresentar propriedades importantes na fabricação de alimentos agindo como culturas iniciadoras e também como probióticos. Este estudo avaliou a resistência de *Lactobacillus paracasei* isolada de fermento de uva à desidratação por atomização (*spray drying*) na presença de leite desnatado reconstituído (LDR) e soro de queijo (SQ). A tolerância *in vitro* à acidez, bile, cloreto de sódio (NaCl) e ao calor foi estudada para as células livres e microencapsuladas. A umidade das microcápsulas foi determinada e a morfologia foi observada por microscopia eletrônica de varredura. A viabilidade das células livres e microencapsuladas diminuiu 4,25 log UFC mL<sup>-1</sup> e 1,00 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente, quando expostas a pH 2,0 durante 3 h. A pH 3,0, houve um decréscimo de 0,3 log UFC mL<sup>-1</sup> para as células livres, enquanto que a forma microencapsulada manteve sua viabilidade mesmo após 3h de exposição. Após 12h de exposição a sais biliares numa concentração de 2g 100 mL<sup>-1</sup>, *L. paracasei* FNU livre e microencapsulada diminuiu 3,34 log UFC mL<sup>-1</sup> e 2,17 log g<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi observada nenhuma perda significativa de células, tanto na forma livre quanto micro encapsulada quando expostas a NaCl, e as células microencapsuladas sobreviveram bem durante 15 min a 65 °C. O teor de umidade das microcápsulas variou entre 4,30 e 4,77 g 100 g<sup>-1</sup>. *L. paracasei* FNU demonstrou possuir desejável resistência *in vitro* ao baixo valor de pH e a sais biliares, e a microencapsulação em LDR e SQ forneceu uma proteção às células contra sais biliares e baixo pH. A cepa

de *L. paracasei* estudada mostrou-se boa candidata para uma investigação mais aprofundada para elucidar seus potenciais benefícios para a saúde e também sua atuação nos processos fermentativos.

Palavras-chave: Microencapsulação, Probiótico, *Lactobacillus paracasei*, Soro de queijo.

## Abstract

Lactic acid bacteria have been isolated from sourdough and could present important properties in food manufacturing as starter cultures and also as probiotics. This study evaluated the resistance of *Lactobacillus paracasei* strain isolated from sourdough to spray drying in the presence of reconstituted skim milk (RSM) and cheese whey (CW). The in vitro tolerance to acid, bile, sodium chloride (NaCl) and heat was studied to free and microencapsulated cells. The microcapsules moisture was determined, and the morphology was observed by scanning electron microscopy. The viability of free and microencapsulated cells decreased by 4.25 log CFU mL<sup>-1</sup> and 1.00 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, when exposed to pH 2.0 for 3 h. At pH 3.0, free cells decreased 0.3 log CFU mL<sup>-1</sup>, while the microencapsulated form maintained its viability even after 3 h of exposure. After 12 h of exposure to 2 g 100 mL<sup>-1</sup> bile salts, free and microencapsulated *L. paracasei* decreased 3.34 log CFU mL<sup>-1</sup> and 2.17 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively. No significant cell loss was observed, for free and microencapsulated form when exposed to NaCl, and microencapsulated cells survived well for 15 min at 65 °C. Moisture content of microcapsules ranged from 4.30 to 4.77 g 100 g<sup>-1</sup>. *L. paracasei* was found to possess desirable in vitro resistance to low pH and bile salts, and the microencapsulation in RSM and CW provided a cell protection against acidic pH and bile salts. This strain is good candidate for further investigation to elucidate its potential health benefits and in fermentation processes.

**Keywords:** Microencapsulation, Probiotic, *Lactobacillus paracasei*, Cheese whey.

## 3.1 INTRODUCTION

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host [1].

Most probiotic bacteria belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Lactobacilli and Bifidobacteria are Gram-positive lactic acid-producing bacteria that constitute a major part of the normal intestinal microbiota in animals and humans. Lactobacilli are found in a variety of habitats where rich, carbohydrate-containing substrates are available, such as human and animal mucosal membranes, on plants or material of plant origin, sewage and fermented milk products, and fermenting or spoiling food [2]. Researchers have reported the benefits of probiotics in outbreaks of diarrhea. The emergence of probiotic foods which are scientifically validated for their efficacy and defined health benefits offers an excellent opportunity to improve public health [3]. According Gregoret et al. [4], although there are several probiotic strains available for commercial use worldwide, the isolation and characterization of new strains is still desirable, mainly in Developing Countries. Different strains of lactic acid bacteria (LAB) have been isolated from sourdough and could present many important properties in food manufacturing as starter cultures and also as probiotics. *Lactobacillus paracasei* strains have shown “in vitro” probiotics properties when isolated from human [5, 6], fermented soybean [7], and olives [8]. Some scientific reports have demonstrated the beneficial effects of strains of *L. paracasei* on the host, including increase in the numbers of lactobacilli in the normal intestinal microflora, effect on nonrotavirus diarrhea, hypocholesterolemic effect, antihypertensive effects, beneficial effects on immunomodulating activity, prevention or alleviation of allergies, and anti-osteoporosis effect [9–11]. Nowadays, the food industry has incorporated probiotic microorganisms in functional foods. To be considered probiotic, the product must show counts of viable cells greater than  $6 \log \text{CFU mL}^{-1}$  or  $\text{g}^{-1}$  throughout the shelf life of the product [1]. In order to exert their beneficial effects after consumption, probiotic organisms must be viable in the food and survive the gastrointestinal ecosystem with pH ranging from 1.0 to 3.0 in the stomach and approximate concentrations of 0.3 % bile salts in the small intestine [12, 13]. Resistance to low pH and high concentration of bile salts are thus important criteria for the selection of probiotic bacteria [14, 15]. As these microorganisms are affected by the conditions cited, microencapsulation is an alternative for effective protection of those [16]. Spray drying is a technique commonly used in food industry that involves atomization of an aqueous or oily suspension of probiotics microorganisms and wall material into a drying gas chamber, resulting in rapid evaporation of water [17]. Several authors have reported its effectiveness in protecting probiotic cells [18–21]. The

main advantages of spray drying is that this technology is less expensive and quicker to produce large quantities of dried cells than other techniques used to preserve microorganisms [22]. Spray drying produces powders with particle sizes in the micrometer scale, which would have a smoother mouth feel than micro-beads and should allow the addition of probiotics to a wider range of foods [18]. Typical carrier materials are mixture of carbohydrates and/or dairy proteins. Usually, protein isolates, gum Arabic, pectin skim milk powder, nonfat dry milk solids, soy, modified starch, maltodextrin, and sugars are employed [16]. Maciel et al. [23] and Schell and Berman [24] applied sweet whey powder as encapsulation material in order to establish an acidic-resistant formulation for dietary probiotics. Cheese whey (CW) is the main by-product of cheese manufacturing and is considered a highly polluting effluent from dairy production due to its high organic load and the generated volume. It is mainly composed of lactose and soluble proteins [25, 26]. The application of valorization technologies to manage cheese effluent is introduced to recover valuable compounds such as proteins and lactose. Currently, valorization processes applied to CW constitute the preferential option to treat this by-product, only exceeded by the production of powdered CW [26]. Burns et al. [27] demonstrated that buttermilk and cheese whey were adequate culture media to produce and freeze biomass of *Lactobacillus* strains. The use of CW as an encapsulating agent is an interesting application for this by-product in order to enhance its utilization and also to decrease the amount of whey discarded as waste. Pimentel-Gonzalez et al. [28] used concentrated whey as an emulsifier for the microencapsulation of probiotic microorganisms, Riveros et al. [29] evaluated whey permeate in microencapsulation by spray dryer of a *L. acidophilus* strain, and De Castro-Cislaghi et al. [25] studied the utilization of liquid whey for encapsulation of *Bifidobacterium* Bb-12 by spray dryer. The *L. paracasei* FNU strain used in this work was isolated from Brazilian grape sourdough and identified by its phenotypic and genetic characteristics [30]. In a previous study, this strain showed antimicrobial activity in vitro against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* (data not published). The letters used for strain nomenclature refer to the sourdough sample in which it was recovered. This present study evaluated the in vitro tolerance of *L. paracasei* FNU to pH values and bile concentrations similar to those found in the human gut, as well its sodium chloride tolerance and survival to heat treatment before and after encapsulation by spray drying in the presence of reconstituted skim milk (RSM) and cheese whey (CW).

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 Strain and culture condition

Stock cultures of *L. paracasei* FNU previously isolated from Brazilian grape sourdough by Aplevicz et al. [30] were maintained in De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (Merck, Germany) added with 200 mL L<sup>-1</sup> glycerol at -80 °C. Working cultures were cultivated in MRS slant agar at 30 °C for 24 h.

### 3.2.2 Microencapsulation of *L. paracasei* FNU by spray drying

#### 3.2.2.1 Feed solution preparation

Cell suspension was prepared in MRS broth by growing the strain 24 h at 30 °C, three times, to reach 1 liter of culture in the stationary phase. After, cells were harvested by centrifugation (17,920×g, 20 min, 4 °C) and washed twice with sterile peptone water (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>). The washed cell pellet was re-suspended to the original volume in 11.0 g 100 mL<sup>-1</sup> RSM (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brazil) and kept under -20 °C into sterile glass bottles [21]. Before microencapsulation, the cell suspension obtained as described above was maintained at 30 °C for 2 h to defrost and added to sterile filtered CW in order to obtain the feed solution (40 mL 100 mL<sup>-1</sup> RSM/60 mL 100 mL<sup>-1</sup> CW) and then submitted to spray drying in a laboratory-scale spray dryer (B-290, Buchi, Flawil, Switzerland). For each batch, the feed solution volume was 600 mL. The powder obtained from the base of the cyclone was stored in sterile plastic bottles at -18 °C.

#### 3.2.2.2 Encapsulating agents and spray dryer conditions

The cheese whey was obtained as described by De Castro-Cislaghi et al. [25] and filtered before sterilization. The CW characteristics were: 6.5 g 100 mL<sup>-1</sup> solid content; 0.75 g 100 mL<sup>-1</sup> protein content; 0.56 g 100 mL<sup>-1</sup> ash; 0.03 g 100 mL<sup>-1</sup> fat content; 5.16 g 100 mL<sup>-1</sup> total carbohydrates; 0.07 (% lactic acid) acidity; and 6.41 pH value. RSM showed 11.0 g 100 mL<sup>-1</sup> solid content, 4.39 g 100 mL<sup>-1</sup> protein content, 6.0 g 100 mL<sup>-1</sup> total carbohydrates, 0.32 g 100 mL<sup>-1</sup> ash content, and 6.7 pH value. Spray dryer conditions were as follows: inlet air temperature of 160 ± 2 °C, outlet air temperature of 55–60 °C, feed flow of 6 mL min<sup>-1</sup>, drying air flow rate of 35 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>, and compressor air pressure of 0.7 MPa.

### 3.2.2.3 Enumeration of *L. paracasei* FNU

To determine the viable cell counts, the entrapped bacteria were released from the microcapsules according to the method proposed by Sheu et al. [31]. One gram of the microcapsules was re-suspended in 9 mL of phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0) followed by homogenization for 10 min and serially diluted with peptone water (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>). *L. paracasei* FNU was enumerated by the pour plate technique on MRS agar (Merck, Germany) with an overlay. The plates were incubated at 30 ± 1 °C for 48 h. After incubation period, the count of viable cells was carried out and expressed as log of colony forming units per gram or mL (log CFU g<sup>-1</sup> or mL<sup>-1</sup>).

### 3.2.2.4 Survival of microencapsulated *L. paracasei* FNU after spray drying

Cell counts of *L. paracasei* FNU were performed before (in the feed solution) and after spray drying. The encapsulation yield was calculated by the following formula:  $EY = (N/N_o) \times 100$ , where  $N_o$  is the number of viable cells in the feed solution of spray drying and  $N$  is the number of viable cells in the obtained powder. Both  $N$  and  $N_o$  are expressed in log CFU g<sup>-1</sup> [32].

## 3.2.3 Physical properties of the microcapsules

### 3.2.3.1 Morphology and particle size

The powder was spread thinly onto a double-sided carbon adhesive disc anchored to the electron microscopy (EM) stub. The sample was then gold-coated with a vacuum sputtering coater (Leica, model EM SCD 500, Wetzlar, Germany), and the morphology and particle size of the microcapsules were examined in a Jeol scanning electron microscope (SEM) model JSM 6390 LV (Jeol, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 10 and 15 kV. To calculate the particle diameter, 150 microcapsules were measured [33].

### 3.2.3.2 Moisture and water activity

The moisture content of the spray-dried powder was determined through oven drying at 102 °C until reaching constant weight, according to the International Dairy Federation [34]. Water activity was measured using AquaLab Series 4TE (Decagon Devices Inc., USA) according to the manufacturer's instructions.

### **3.2.4 Effect of pH and bile salts on survival of free and microencapsulated bacteria**

The tolerance of *L. paracasei* FNU to acidic conditions was evaluated according Gao et al. [35] with modifications, adjusting MRS broth with 5 mol L<sup>-1</sup> HCl to pH 2, 3, 5, and 7 (control). Approximately 108 CFU mL<sup>-1</sup> of free cells and 1.0 g of microcapsules powder were inoculated into 10 mL of acidified MRS broth and incubated at 37 °C for 3 h and samples were taken at 1-h intervals for enumeration. Acid tolerance was determined by comparing the final plate count after incubation time with the initial plate count at 0 h. To determine the resistance to bile salts, free and microencapsulated cells were inoculated in 10 mL of MRS broth containing 0 (control), 0.5, 1.0, and 2.0 g 100 mL<sup>-1</sup> bile salts (Sigma-Aldrich, USA, product number B8756). Samples were collected after incubation at 37 °C for 0, 3, 6, 9, and 12 h [36] and enumerated on MRS agar.

### **3.2.5 Tolerance to NaCl**

Effect of high NaCl concentration was evaluated according to Sabikhi et al. [37]: 0.1 g of the microencapsulated culture and 1 mL of a free cells suspension (108 CFU mL<sup>-1</sup>) were added to 10 mL MRS broth containing concentrations of 0 (control), 1.0, 1.5, and 2.0 g 100 mL<sup>-1</sup> sodium chloride and incubated at 37 °C for 1, 2, and 3 h. The enumeration of free and microencapsulated cells was performed before and after incubation time.

### **3.2.6 Heat resistance assay**

The tolerance of free and microencapsulated *L. paracasei* FNU to heat was determined according to the methodology of Ding and Shah [38] with modifications: 0.1 g of the microencapsulated culture and 1 mL of a free cells suspension were transferred to 10 mL tubes of peptone water 0.1 g 100 mL<sup>-1</sup> preheated to 65 °C. The samples were kept at 65 °C in a water bath for 0, 15, and 30 min and then cooled in chilled water. Viable cell counts were performed immediately before and after exposure to heat.



### 3.2.7 Data analysis

All experiments and analyses were run in triplicates. Significant differences between the means of data ( $p < 0.05$ ) were determined using Tukey's test. Statistical analysis was carried out using STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

## 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.3.1 Encapsulation yield (EY)

In the present study, the survival of *L. paracasei* after microencapsulation by spray drying was  $93.12 \pm 2.15 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  (Table 3.1). This result can be explained by the fact that a fresh culture harvested from stationary phase has been used in a suspension with RSM and CW, also by the outlet temperature that was around  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , since there are evidences that the survival of probiotics after spray drying depends on the types and concentrations of the encapsulating agent and the outlet temperature and considering that cell culture from stationary phase in general exhibits better survival than that from log phase [39]. This result is in agreement of that obtained by Reedy et al. [40] where more than 97 % survival was exhibited by three LAB spray-dried with maltodextrin and skim milk as carriers. Similar results were found by Gardiner et al. [5], with survival rates for *L. paracasei* NFBC 338 varying from  $97 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  at an outlet temperature of  $70\text{--}75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  at  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$  during spray drying with skim milk medium at an inlet temperature of  $170 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Maciel et al. [23] produced microcapsules from reconstituted sweet whey or skim milk (30 % total solids) inoculated with a suspension of *L. acidophilus* La-5 and subjected to spray drying at inlet and outlet temperatures of 180 and  $85\text{--}95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. They obtained an average encapsulation yield of  $76.58 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . According Rokka and Rantamäki [17], typical survival rates at spray drying and freeze drying microencapsulation are in the range of  $70\text{--}85 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ; however, cells from fresh cultures seem to survive better than freeze-dried cultures to the processes of microencapsulation by emulsion and spray drying methods. Spray drying process requires the feed solution in liquid form to fit the current equipment design. The high water concentration is helpful in keeping the temperature of drying material at around the wet-bulb temperature, consequently preventing cells from being overheated by the high inlet temperature. For some

liquid carriers, the exact protective mechanism remains unclear, for example, reconstituted skim milk (RSM) [41].

Table 3.1: Viable cell counts of *L. paracasei* FNU in the feed solution, in the microcapsules powder and encapsulation yield (EY).

Feed solution (log CFU g <sup>-1</sup> )	*10,20 ± 0,21
Microcapsules powder (log CFU g <sup>-1</sup> )	*9,49 ± 0,07
EY (g 100 g <sup>-1</sup> )	*93,12 ± 2,15

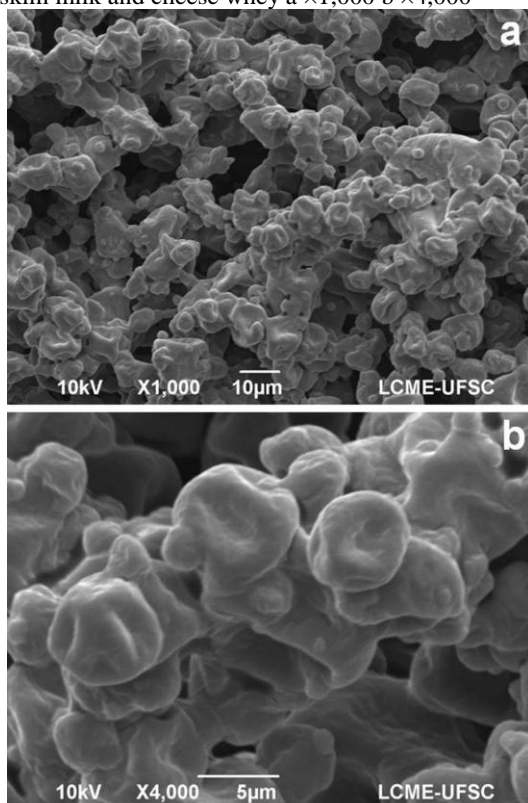
\* Means ± standard deviation (*n* = 3).

### 3.3.2 Physical properties of the microcapsules

#### 3.3.2.1 Morphology

The SEM images for spray-dried *L. paracasei* FNU (Fig. 3.1) revealed the absence of free bacteria confirming the formation of microcapsules. The microcapsules showed a rounded external surface and various sizes, containing concavities or flattening typical of atomized products. There was no evidence of surface fissures or rupture of the microspheres which confirms good structural integrity and suggests low gas permeability e.g., oxygen and water vapor [18, 42]. The same morphology was observed in microcapsules of *Bifidobacterium* BB12 microencapsulated with sweet whey [25], *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules produced with different encapsulating agents [42] and Lactobacilli skim milk microcapsules [19]. According to Saénz et al. [43], the formation of concavities in the surface of atomized microcapsules can be attributed to the shrinkage of the particles during the drying process because of the rapid evaporation of the liquid drops. Rodríguez- Huevo et al. [44] reported that moderate drying temperatures (as 140 °C inlet and 60 °C outlet) cause concavities on the microcapsule surface. However, this effect gives characteristics such as resistance to mechanical fracture and solute diffusion to the obtained powder. According to Lian et al. [45], regardless of carriers used for drying *Bifidobacterium infantis* and *B. longum*, the microparticles obtained were spherical and varied in size. However, the formation of concavities called “flat ball effect” and the extension to which this effect occurs depends on the encapsulating agent used.

Figure 3.1: SEM images of microcapsules of *L. paracasei* FNU obtained by spray drying with skim milk and cheese whey a  $\times 1,000$  b  $\times 4,000$



### 3.3.2.2 Particle size

In this study, the capsules size was  $10,96 \pm 2,81 \mu\text{m}$ . Particles of similar size ( $11.2 \mu\text{m}$ ) were obtained by De Castro-Cislaghi et al. [25] for *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying using whey as wall material. The particle size is influenced by the characteristics of the feed solution to the dryer (for example, total solids and viscosity) as well as the spray drying parameters as spray nozzle type, atomization pressure, feeding rate, and so on [46]. According to Fang and Bhandari [47] the typical shape of spray dried particles is spherical, with a mean size range of 10 x 100 mm.

### 3.3.2.3 Moisture and Water activity

The powder obtained in microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* FNU with RSM and CW had a moisture content ranging from 4.30 to 4.77g 100g<sup>-1</sup>, which can be explained by the outlet temperature of spray drying between 55 and 60 ° C. The moisture content and water activity of dried probiotic cultures must be kept constant in order to achieve long-term storage stability. In this case, water activity and moisture content should be below 0.25 and 5g 100g<sup>-1</sup>, respectively [48]. The spray dryer operating conditions should be set to reach temperatures close to or below 60°C at the air discharge point to assure the obtainment of a product with less than 10 g 100 g<sup>-1</sup> moisture [29].

The moisture content found in this study can prevent cell death during storage of dried culture. This result is similar to that described by Fávoro - Trindade and Grosso [49], they found a moisture content between 3.2 to 5.3g 100g<sup>-1</sup> in the powders obtained in microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La - 05 and *Bifidobacterium lactis* Bb -12 by spray drying , with an outlet temperature of 75 °C. Maciel et al. [23] report moisture contents below 5g 100g<sup>-1</sup> for *L. acidophilus* La-5 spray dried in reconstituted skim milk and whey powder.

The average water activity of the powder obtained in this study was 0.23 ± 0.008. The required water activity for the survival of microencapsulated microbial populations in milk-based media ranges between 0.28 and 0.65 [50]. In this way, our results are within the range recommended for good stability of microencapsulated cultures since it represents less free water available for biochemical reactions and hence longer shelf life [42]. Similar results have been found in studies with microcapsules of microorganisms on cellulose phthalate containing whole milk or whey proteins where water activity ranged from 0.107 to 0.230 [51] and in microcapsules of *Bifidobacterium lactis* Bb -12 with water activity values below 0.3 [42]. Rokka and Rantamäki [17] report other tests where the water activity ranged from 0.2 - 0.3 in microcapsules containing oil, caseinate, oligosaccharides and dehydrated glucose syrup or resistant starch as an encapsulating agent.

### 3.3.3 Effect of pH and bile salts on survival of free and microencapsulated *L. paracasei* FNU

The effect of acidic conditions on the viability of *Lactobacillus paracasei* FNU at different pH values is showed in Fig 3.2. The viability

of free cells decreased by 4.25 log CFU mL<sup>-1</sup> when exposed to pH 2.0 for 3 hours. This decrease was not observed when the cells were encapsulated ( $p < 0.05$ ). In this case, the decrease was 1 log CFU g<sup>-1</sup>, indicating that microencapsulation in RSM and CW provided a cell protection against the acidic pH. At pH 3.0, there was a small decrease in the population of free cells, approximately 0.3 log CFU mL<sup>-1</sup>, while the microencapsulated strain maintained its viability even after 3 hours of exposure, the same occurring for pH 5.0 and 7.0. Ding and Shah [38] observed for *Lactobacillus paracasei* encapsulated in alginate that free cells decreased by 7.0 log CFU mL<sup>-1</sup> at pH 2.0 at the end of 2 hours of exposure while cells encapsulated in alginate suffered a decrease of 3.8 log CFU g<sup>-1</sup> in the same conditions. Similar results were observed by Bendali et al. [6] in a study with *Lactobacillus paracasei* strain isolated from humans which maintained its viability when exposed to pH 3.0 for 3 hours and Argyri et al. [8] when they studied the viability of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* exposed to pH 2.5.

Before reaching the intestinal tract, probiotic bacteria must survive passage through the stomach. In this compartment, the secretion of gastric juice is a primary defense mechanism against the majority of ingested microorganisms. The human stomach pH ranges between 2.0 and 3.0 and the time that food remains in the organ revolves around three hours [35]. Although in vitro simulation does not predict responses on the functionality of these microorganisms in the human body, it is helpful in assessing survival of probiotics in different food matrices during passage through the gastrointestinal tract [52].

Free *Lactobacillus paracasei* FNU grew well in the absence and in the presence of bile salts concentration of 0.5g 100mL<sup>-1</sup> until 9 hours incubation (Fig. 3.3), showing a reduction of 3.34 log CFU.mL<sup>-1</sup> after 12 hours incubation in the presence of 2g 100mL<sup>-1</sup> bile salts. Microencapsulated cells remained viable within 12 hours of incubation with 1g 100mL<sup>-1</sup> bile salts, with a decrease of 2.17 log CFU g<sup>-1</sup> in bile salts concentration of 2g 100mL<sup>-1</sup>. These results show that this strain has strong resistance to bile salts and suggest the possibility of its survival in the human gastrointestinal tract. Compared with fresh culture, spray-drying enhanced the resistance of *Lactobacillus paracasei* FNU to acidic conditions and presence of bile salts ( $p < 0.05$ ). Strong resistance to bile salts was also found in *L. paracasei* IMC 502 and *L. paracasei* A 13 [53, 19]. Bile tolerance is considered as an important characteristic of *Lactobacillus* strains, which enables them to survive, grow, and exert their action in gastrointestinal transit [8]. The mean bile concentration in intestinal is about 0.3 g 100 mL<sup>-1</sup> and the time of food

through the small intestine is generally regarded as between 1 and 4h [35].

Figure 3.2: Survival of free (FC) and microencapsulated (MC) *L. paracasei* FNU cells, incubated at 37 °C for 3 h in MRS pH 7.0, 5.0, 3.0 and 2.0.

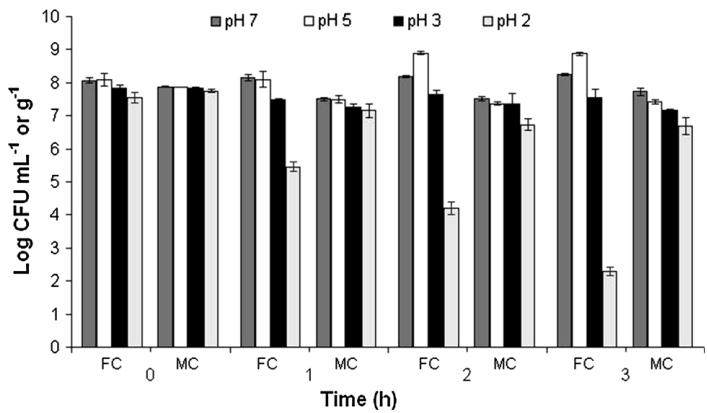
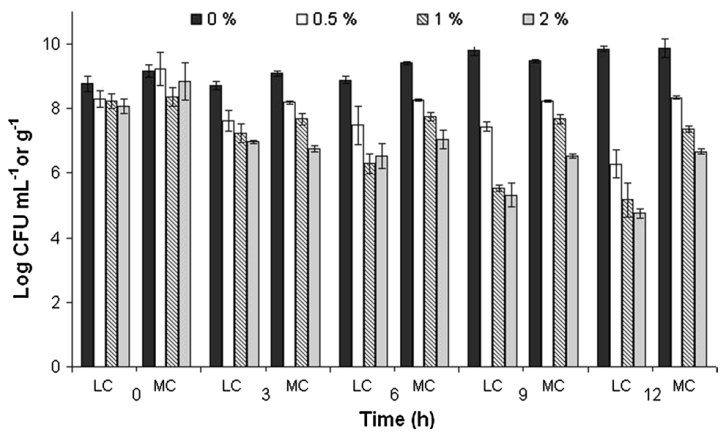


Figure 3.3: Survival of free (FC) and microencapsulated (MC) *L. paracasei* FNU cells, incubated at 37° C for 12 h in MRS supplemented with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 g 100 mL<sup>-1</sup> bile salts



### 3.3.4 Tolerance to NaCl

It was observed that the NaCl concentrations tested in this study did not affect the survival of free and microencapsulated *L. paracasei*

FNU at the evaluated concentrations, since no significant differences ( $p > 0.05$ ) were detected between salt supplemented cultures and control. Similar results were found by Gregoret et al. [4], when NaCl did not inhibit, at the concentrations evaluated (1 and 2 %), the growth of *L. paracasei* JP1. Several foods contain salt as a taste enhancer or as a preservative. The NaCl content of probiotic foods might jeopardize the cell viability of probiotic cultures. Salts commonly used in cheeses, for example, could affect the viability and functionality of probiotic strains present in the food matrix [4]. Thus, it is desirable that starters or probiotics microorganisms can withstand concentrations of NaCl.

### 3.3.5 Heat resistance

Table 3.2 shows the viable cells counts of free and microencapsulated *L. paracasei* FNU exposed to 65 °C during 30 min. There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between survival of free and microencapsulated cells when exposed to 65 °C in each time of incubation. Significant reduction ( $p < 0.05$ ) in free cell counts was observed during the time of incubation when compared with initial count; however, microencapsulated cells remained viable for 15 min of exposure. This result demonstrates that microencapsulation had a protective effect against heat. Few studies have compared protection by microencapsulation against lethal heat; however, Borges et al. [54] found similar results for *L. paracasei* L26 microencapsulated by extrusion in an alginate matrix. Ding and Shah [38] found that microencapsulated probiotic bacteria survived well during 30 min at 65 °C compared to free probiotic bacteria at the same time.

Table 3.2: Survival of free and microencapsulated *L. paracasei* FNU at 65 °C

Time (min)	0	15	30
Free cells (Log CFU mL <sup>-1</sup> )	8.69 ± 0.12 <sup>aA</sup>	7.79 ± 0.08 <sup>aB</sup>	5.91 ± 0.16 <sup>aC</sup>
Microencapsulated cells (Log CFU g <sup>-1</sup> )	8.71 ± 0.07 <sup>aA</sup>	8.17 ± 0.46 <sup>aA</sup>	6.06 ± 0.14 <sup>aB</sup>

Different lowercase letters in the same column indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between means

Different uppercase letters in the same line indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between means

\* Results expressed as mean ± standard deviation ( $n = 3$ )

### 3.4 CONCLUSIONS

The *L. paracasei* strain studied was found to possess desirable in vitro resistance to low pH and bile salts, so this strain is good candidate for further investigation to elucidate its potential health benefits and in fermentation processes to assess its technological performance as probiotic starter. RSM and CW, in the proportions used, appeared to be effective in protecting *L. paracasei* FNU during the spray dryer process and the microencapsulation provided a cell protection against the acidic pH and bile salts.

**Acknowledgments** The authors thank to Electronic Microscopy Central laboratory of Federal University of Santa Catarina (LCME—UFSC).

**Conflict of interest** None.

**Compliance with Ethics Requirements** This article does not contain any studies with human or animal subjects.

### 3.5 REFERENCES

- [1] FAO/WHO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, 2006. 45 p. Available in: FTP://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a512s00pdf. Accessed 12 december 2013.
- [2] De Vrese, M. Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics (2008) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111: 1 - 66.
- [3] Franz, C.M.A.P. Huch, M. Mathara, J. M. Abriouel, H. Benomar, N. Reid, G. Galvez, A. Holzapfel, W.H. (2014) African fermented foods and probiotics. Int. J.Food Microbiol. 190: 84 -96.
- [4] Gregoret,V. Perezlindo, M.J. Vinderola, G. Reinheimer, J. Binetti, A. (2013) A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. Food Microbiol. 34: 19 - 28.
- [5] Gardiner, G. E. O'sullivan, E. Kelly, J. Auty, M. A. E. Fitzgerald, G. F. Collins, J. K. Ross, R. P. Stanton, C. (2000) Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus*



*paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2605–2612.

[6] Bendali, F. Durand, A. Hebraud, M. Sadoun, D. (2011) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: an Algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. J. Food Nutr. Res. 50 (3):139–149.

[7] Thi, L. N. Champagne C.P., Lee, B.H. Goulet, J. (2003) Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey Int. J. Food Microbiol. 89: 67– 75.

[8] Argyri, A. A. Zoumpopoulou, G. Karatzas, K. G. Tsakalidou, E. Nychas, G. J. E. Panagou, E. Z. Tassou, C. C. (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests Food Microbiol. 33: 282-291.

[9] Sullivan, A. Palmgren, A. C. Nord, C. E. (2001) Effect of *Lactobacillus paracasei* on intestinal colonization of lactobacilli, bifidobacteria and *Clostridium difficile* in elderly persons. Anaerobe 7 (2): 67-70.

[10] Sarker S. A. Sultana, S. Fuchs, G. J. Alam, N. H. Azim, T. Brüssow, H. Hammarström L. (2005) *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. Pediatrics 116(2): 221-228.

[11] Chiang, Shen-Shih & Pan, Tzu-Ming (2012) Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 903–916.

[12] Mainville, I. Arcand, Y. Farnworth, E.R. (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. Int. J. Food Microbiol. 99: 287-296.

[13] Shah, N. P. (2007) Functional cultures and health benefits. Int. Dairy J. 17: 1262-1277.

[14] Todorov, S. D. Dicks, L.M.T. (2008) Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Ann. Microbiol.* 58: 661–670.

[15] Jensen, H. Grimmer, S. Naterstad, K. Axelsson, L. (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria *Int. J. Food Microbiol.* 153: 216–222.

[16] Nedovic, V. Kalusevic, A. Manojlovic, V. Levic, S. Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* 1: 1806 – 1815.

[17] Rokka, S. Rantamäki, P. (2010) Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 1–12.

[18] Yonekura, L. Sun, H. Soukoulis, C. Fisk, I. (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion *J. Funct. Foods* 6: 205–214.

[19] Paéz , R. Lavari L. Audero, G. Cuatrin, A. Zaritzky, N. Reinheimer, J. Vinderola, G. (2013) Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. *Int. J. Dairy Technol.* 66 (2): 155-161.

[20] Semyonov D. Ramon, O and Shimoni, E. (2011) Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT-Food Sci.Technol.* 44: 1844–1852.

[21] Golowczyc, M. A. Silva, J. Teixeira, P. De Antoni, G. L. Abraham, A. G. (2011) Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 556–560.

[22] Cook, M. T. Tzortzis, G. Charalampopoulos, D. Khutoryanskiy, V. V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control. Release* 162: 56–67.

[23] Maciel, G. M. Chaves, K. S. Grosso, C. R. F. Gigante, M. L. (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials J. Dairy Sci. 97 :1991–1998.

[24] Schell,D. Beermann, C. (2014) Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival Food Res. Int. 62:308–314.

[25] De Castro-Cislaghi, F. P. Silva, C.R. Fritzen-Freire, C. B. Lorenz, J. G., Sant'anna, E. S. (2012) *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. J. Food Eng. 113 (2): 186-193.

[26] Prazeres A. R. Carvalho, F. Rivas, J. (2012) Cheese whey management: A review. J. Environ. Manage. 110: 48-68.

[27] Burns P Vinderola G Molinari F Reinheimer J (2008) Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. Int. J. Dairy Technol. 61 (2): 156-164.

[28] Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J. (2009) Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Res. Int. 42: 292–297.

[29] Riveros, B. Ferrer, J. Borquez, R. (2009) Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. Drying Technol. 27: 123–132.

[30] Aplevicz, K. S. Mazo, J. M. Ilha, E. C. Dinon, A. Z. Sant'Anna, E. S. (2014) Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the brazilian grape sourdough. Braz. J. Pharm. 50 (2): 321–327.

[31] Sheu,T. Y.; Marshall, R. T. (1993) Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J. Food Sci. 54: 557–561.

[32] Annan, N. T. Borza, A. D. Truelstrup, H. L (2008) Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions Food Res. Int 41: 184–193.

[33] krasaekoopt, W. Bhandari, B. Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int. Dairy J. 14: 737–743.

[34] IDF (International Dairy Federation) (1993) Dried milk and dried cream: Determination of water content. International Dairy Federation standard 26A. Brussels, Belgium: Int. Dairy Federation.

[35] Gao Y. Li, D. Liu, S., Liu, Y (2012) Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. Eur. Food Res. Technol. 234: 45–51.

[36] Todorov S. D. Dicks L.M.T. (2008) Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. Ann. Microbiol. 58: 661–670.

[37] Sabikhi, L. Babu, R. Thompson, D. K.; Kapila, S. (2010) Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. Food Bioprocess Technol. 3: 586–593.

[38] Ding, W. K. and Shah, N.P. (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. J. Food Sci. 72: M446-M450.

[39] Corcoran, B. M.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. J. Appl. Microbiol. 96: 1024–1039.

[40] Reddy, K. B. P.; Madhu, A. N. and Prapulla, S. G. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria, 2009. Int.l J. Dairy Technol. 62 (2): 240–248.

[41] Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Res. Int.* 44: 1127–1149.

[42] Fritzen-Freire, C. B. Prudencio, E. S. Amboni, R. D. M. C. Pinto, S. S. Negrao-Murakami, A. N. & Murakami, F. S. (2012) Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res. Int.* 45: 306–312.

[43] Saénz, C. Tapia, S. Chávez, J. & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 114: 616–622.

[44] Rodríguez-Huezo, M. E. Durán-Lugo, R. Prado-Barragán, L. A. Cruz-Sosa, F. Lobato- Calleros, C. Alvarez-Ramírez, J. et al. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Res. Int.* 40: 1299–1306.

[45] Lian, W.C. Hsiao, H.C. Chou, C.C. (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 79–86.

[46] Ying, D. Y. Phoon, M. C. Sanguansri, L. Weerakkody, R. Burgar, I. and Augustin, M. A. (2010) Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *J. Food Sci.* 75 (9): E588 – E595.

[47] Fang Z X & Bhandari B (2010) Encapsulation of polyphenols—A review. *Trends Food Sci. Technol.* 21: 510–523.

[48] Peighambardoust, S. H. Tafti, A. G. and Hesari, J. (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 22:215–224.

[49] Favaro-Trindade, C.S. Grosso, C.R.F. (2002) Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsul.* 19: 485–494.

[50] Desmond, C. Ross, R. P. O'callaghan, E. Fitzgerald, G. and Stanton, C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. J. Appl. Microbiol. 93: 1003–1011.

[51] Picot, A. Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. Dairy J. 14: 505–515.

[52] Paéz , R. Lavari LI. Vinderola, G. Audero, G. Cuatrin, A. Zaritzky, N. Reinheimer, J. (2012) Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. Food Res. Int. 48: 748–754.

[53] Verdenelli, M. C. I; Ghelfi, F.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cecchini, C.; Cresci, A.(2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. Eur. J. Nutr. 48: 355–363.

[54] Borges, S. Barbosa, J. Camilo, R. Carvalheira, A. Silva, J. Sousa, S. Gomes, A. M. Pintado, M. M. Silva, J. P. Costa, P. Amaral, M. H.; Teixeira, P. Freitas, A. C. (2012). Effects of encapsulation on the viability of probiotic strains exposed to lethal conditions. Int.J. Food Sci. Technol. 47: 416–42.



## CAPÍTULO 4

Artigo submetido para publicação

### **4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO E COMPARAÇÃO ENTRE PCR EM TEMPO REAL E MÉTODO DE PLAQUEAMENTO PARA ENUMERAÇÃO DE *L. paracasei* EM IOGURTE**

Comparison of bacterial DNA extraction methods and comparison of Real-time PCR assay and plate count for *L. paracasei* enumeration in yoghurt

Eunice C. Ilha, Mirella C. Scariot, Diana Treml, Tomas P. Pereira, Ernani S. Sant'Anna, Elane S. Prudêncio, Ana C. M. Arisi

#### **RESUMO**

*Lactobacillus paracasei* é uma bactéria láctica mesófila, tecnologicamente ativa na fermentação de alimentos. Métodos independentes de cultivo foram rapidamente reconhecidos como uma valiosa alternativa aos métodos dependentes de cultivo para enumeração de bactérias lácticas. No presente trabalho, a eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA de iogurte foram comparados, a PCR em tempo real (qPCR) tendo o gene *tuf* como alvo foi avaliada para enumeração de *L. paracasei*, e os resultados da qPCR e as contagens em placas de *L. paracasei* em amostras de iogurte foram comparados. As concentrações totais de DNA de iogurtes comerciais foram maiores utilizando o método DNAzol 2 do que as concentrações de DNA obtidas pelos outros métodos testados. As curvas padrão apresentaram valores médios de eficiência adequados; 91% (cepa pura *L. paracasei* CTT 7501), 95% (cepa pura *L. paracasei* FNU) e 103% (iogurte com *L. paracasei* FNU). LOD é de 3 log do número de cópias de DNA, o que corresponde a 2,78 log UFC, uma faixa adequada de enumeração de unidades formadoras de colônia de bactérias probióticas em amostras de iogurte, uma vez que eles devem estar presentes em grandes quantidades. *L. paracasei* (UFC) enumeradas por qPCR foram comparados com *L. paracasei* cultiváveis enumerados por cultivo em placas aos 7, 14, 21 e 28 dias de fabrico de iogurtes. Foram observadas diferenças entre qPCR e contagens em placas apenas 28 dias após a



preparação de iogurte, as contagens foram semelhantes aos 7, 14 e 21 dias. Neste estudo, a contagem de *L. paracasei* por qPCR em iogurte foi realizada com sucesso.

Palavras-chave: *Lactobacillus paracasei*; PCR quantitativa; enumeração de microrganismos; iogurte; gene *tuf*

## ABSTRACT

*Lactobacillus paracasei* is a mesophilic lactic acid bacterium technologically active in food fermentation. Culture-independent methods have rapidly been recognized as a valuable alternative to culture-dependent methods for lactic acid bacteria enumeration. In the present work, the efficacy of different protocols to extract DNA from yoghurt were compared, real-time PCR (qPCR) targeting *tuf* gene for *L. paracasei* enumeration was evaluated, and qPCR and plate counts of *L. paracasei* in yoghurt samples were compared. Total DNA concentrations from commercial yoghurts were higher using DNAzol method 2 than using the other tested methods. Standard curves presented suitable mean efficiency values of 91% (pure *L. paracasei* strain CTT 7501), 95% (pure *L. paracasei* strain FNU) and 103% (yoghurt with *L. paracasei* strain FNU). Limit of detection is 3 log DNA copy number, corresponding to 2.78 log CFU, a suitable range of CFU enumeration for probiotic bacteria in yoghurt samples, considering that they should be presented in large amounts. The *L. paracasei* (CFU) enumerated by qPCR were compared to culturable *L. paracasei* enumerated by plate counts at 7, 14, 21 and 28 days of yoghurt manufacture. Differences between qPCR and plate counts were observed only 28 days after yoghurt preparation, counts were similar at 7, 14 and 21 days. In this study, qPCR count of *L. paracasei* in yoghurt was successfully achieved.

Keywords: *Lactobacillus paracasei*; quantitative PCR; Bacterial enumeration; Yoghurt; *Tuf* gene.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Espécies de lactobacilos estão envolvidas em fermentação espontânea e em processos de fermentação em grande escala para a transformação e preservação de muitas matérias – primas tais como leite (Furet et al. 2004; Rushdy and Gomaa 2013). Cepas de lactobacilos vêm sendo utilizadas comercialmente, ao longo dos últimos anos, por possuírem características probióticas (Francesca et al. 2013; Herbel et al. 2013).

Os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro". No entanto, para exercer esses efeitos benéficos à saúde, a população de bactérias probióticas viáveis deve ser de cerca de  $6 \log \text{UFC g}^{-1}$  de produto no momento do consumo (Roy, 2005).

Entre os diversos produtos alimentícios, o iogurte ou produtos semelhantes têm sido utilizados mais frequentemente como veículos para a incorporação de microrganismos probióticos (Kristo et al., 2003). Iogurte é reconhecido como um produto dietético com muitos efeitos desejáveis. É produzido a partir do crescimento simbiótico de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estas bactérias parecem não sobreviver à passagem gástrica nem seriam capazes de colonizar o intestino, sendo assim, não devem desempenhar um papel no intestino humano. Por isso, a tendência recente é adicionar bactérias probióticas ao iogurte (Ashraf e Shah 2011).

*Lactobacillus paracasei* é uma bactéria láctica, mesófila, tecnologicamente ativa em fermentação de alimentos. *L. paracasei* subsp. *paracasei* 101 NTU e seus produtos fermentados provou ser eficiente na gestão de níveis de pressão arterial e de colesterol no sangue, prevenção de desenvolvimento de lesão da mucosa gástrica, imunomodulação e alívio de alergias, bem como demonstrou efeito anti-osteoporose e inibição do acúmulo de tecido adiposo (Chiang e Pan 2012). *L. paracasei* M7 inibiu a adesão de *Salmonella* às células epiteliais (Xue et al. 2014). *L. paracasei* FNU demonstrou possuir resistência aos sais biliares e baixo pH em testes *in vitro* (Ilha et al. 2014).

Atualmente, apesar de seu impacto econômico, a maior parte dos ensaios que são utilizados para identificar e quantificar os lactobacilos são métodos microbiológicos clássicos, demorados e onerosos. Os lactobacilos são frequentemente difíceis de serem diferenciados por meio de técnicas microbiológicas clássicas já que a

maioria deles têm necessidades nutricionais e de crescimento semelhantes (Kao et al 2007; Poltronieri et al. 2008). Geralmente os produtos lácteos, como iogurte e queijo, possuem uma população de várias espécies de bactérias lácticas intimamente relacionadas. Além disso, a análise das características fenotípicas é sempre demorada e trabalhosa.

Métodos independentes de cultivo foram rapidamente reconhecidos como uma alternativa valiosa para métodos convencionais, dependentes de cultivo (Agrimonti et al. 2013; Ceccherini et al. 2013; De Medici et al. 2014; Ilabaca et al. 2014; Ke et al. 2014; Reitschuler et al. 2014; Rodriguez-Lazaro et al. 2014; Ruiz et al. 2014). Estes métodos podem basear-se na análise direta do DNA extraídos da matriz alimentar (Achilleos e Berthier 2013; Rodríguez et al 2012).

A extração do DNA é um passo crucial para a obtenção de resultados confiáveis na quantificação de DNA por PCR em tempo real (Cankar et al. 2006; Garcia et al. 2013; Oliveira et al. 2013; Tian et al. 2013). A amplificação do DNA bacteriano por PCR a partir de amostras de leite pode ser afetada pela presença de substâncias inibidoras tais como  $\text{Ca}^{2+}$ , gordura e proteínas (Machado et al. 2013), por isso, a obtenção de DNA de boa qualidade para fins de PCR a partir de amostras de produtos lácteos é um desafio (Pirondini et al. 2010; Quigley et al. 2012).

A fim de monitorar bactérias lácticas em produtos lácteos, métodos moleculares, baseados na amplificação do DNA bacteriano por PCR em tempo real, tem sido desenvolvidos com sucesso para *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. reuteri* em iogurte (Herbel et al. 2013) e para *S. thermophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* em outros produtos lácteos fermentados (Furet et al., 2004).

Vários pares de iniciadores espécie-específicos foram desenvolvidos com base na variabilidade de seqüências 16S rRNA para diferenciar cinco cepas de lactobacilos que foram adicionadas a produtos probióticos em Taiwan (Kao et al., 2007). Iniciadores espécie-específicos identificaram facilmente *L. acidophilus* e *L. delbrueckii*, mas não puderam ser utilizados para distinguir *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (Kao et al., 2007).

Recentemente, foi desenvolvido um ensaio de PCR em tempo real para quantificar *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei* em queijo tendo como gene alvo o fator de elongação (Achilleos e Berthier 2013). O fator de elongação (gene *tuf*) mostrou ser altamente variável entre bactérias produtoras de ácido láctico, especialmente entre espécies

intimamente relacionadas, tais como as do grupo *L.casei* (Chavagnat et al 2002; Yu et al 2012).

No presente estudo, *L. paracasei* FNU foi incorporada a iogurte como uma cepa probiótica. Esta cepa foi previamente caracterizada como sendo resistente a baixos valores de pH e elevadas concentrações de sais biliares (Ilha et al. 2014). Os objetivos do presente estudo foram verificar a viabilidade de *L. paracasei* FNU em iogurte através da enumeração por contagem em placas, comparando com a quantificação por PCR em tempo real, comparar a eficiência de protocolos de extração do DNA de iogurte, e avaliar a utilização do gene *tuf* como alvo na quantificação de *L. paracasei* por PCR em tempo real em amostras de iogurte.

As inovações deste trabalho são a comparação de métodos de extração de DNA de bactérias que fornecem diferentes rendimentos de extração; a contagem de bactérias para verificar a sobrevivência da cultura adicionada durante 28 dias de armazenamento e a utilização de iniciadores *Tuf* para quantificação do DNA de *L. paracasei* em uma nova matriz, iogurte, contendo elevada população de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, no lugar de queijo, como proposto anteriormente (Achilleos e Berthier 2013)

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para o teste de especificidade dos iniciadores, cepas de *Lactobacillus paracasei* FNU, isolada de fermento de uva (Ilha et al 2014.); *Lactobacillus paracasei* CCT 7501 adquirida da coleção de culturas da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil); *Lactobacillus paracasei* LY0 750 fornecida pela Danisco (Cotia, São Paulo, Brasil); *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) adquirido de ATCC (Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em De Man, Rogosa e Sharp (MRS) caldo (Merck, Alemanha) a 30 °C durante 24 horas. Além disso, *Pseudomonas* spp. foi cultivada em caldo de Luria-Bertani (USB, Cleveland, Ohio, EUA) a 28 °C, *Escherichia coli* (ATCC 25922, Manassas, VA, EUA) foi cultivada em caldo Brain-Heart Infusion (BHI - Himedia, Pennsylvania, EUA), enquanto que *Bacillus cereus* (ATCC 14579, Manassas, VA, EUA) foi cultivado em caldo nutriente (Himedia, Pensilvânia, EUA) a 37 °C durante 24 horas. A densidade óptica (DO) das culturas bacterianas foi medida a 600 nm utilizando Espectrofotômetro Hitachi U2910 (Illinois, EUA).

*Lactobacillus acidophilus* (LA-5, Chr. Hansen, Hónsholm, Denmark) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12, Chr. Hansen, Hónsholm, Dinamarca) foram mantidos em leite integral UHT a -20 °C e ativadas a 37 °C por 2 horas. A cultura iniciadora termofílica foi preparada utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Yo-Flex® L812), Chr. Hansen, Horsholm, Denmark) de acordo com instruções do fabricante.

#### **4.2.2 Preparação da cultura de *L. paracasei* FNU para adição no iogurte**

A suspensão de células foi obtida a partir de cultura em agar inclinado.

Uma alçada da cultura estoque foi inoculada em tubo com 10 mL de caldo MRS (Difco, Sparks, MD, EUA), incubada a 30 °C por 24 horas. Este processo foi repetido por três vezes até que a cultura atingiu um volume de 1000 mL na fase estacionária. O caldo fermentado foi centrifugado a 17,920 x g por 20 min a 4 °C (Nova técnica, NT 825), lavado com água peptonada estéril (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>) por duas vezes e a biomassa foi ressuspensa em 500 mL de leite UHT, e mantida a -20 °C em frascos de vidro estéreis.

A enumeração de células viáveis na suspensão em leite integral UHT após congelamento foi realizado em Agar MRS.

#### **4.2.3 Preparação do iogurte**

O iogurte controle foi preparado com leite integral UHT com adição de cultura iniciadora contendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 45°C, até atingir o pH de 4,6, seguido de resfriamento até 4 °C e armazenamento a 4 °C durante 24 horas. O iogurte pronto foi então dividido em dois lotes: 1) Iogurte controle (sem adição de *L. paracasei* FNU) e 2) Iogurte adicionado da suspensão de leite UHT com *L. paracasei* FNU (8 log CFU.mL<sup>-1</sup> de concentração final). Os iogurtes foram distribuídos em frascos de vidro estéreis e mantidos a 4 °C. Foram retiradas alíquotas em intervalos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a preparação.

As alíquotas foram utilizadas imediatamente após a coleta para a enumeração em placas ou armazenadas a -20 °C para posterior extração do DNA.

Iogurtes probióticos comerciais, denominados iogurte A e iogurte B, foram adquiridos em supermercados locais e utilizados na avaliação dos protocolos de extração de DNA.

#### **4.2.4 Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA**

Diferentes protocolos de extração de DNA foram avaliados: DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen, Venlo, Holanda), DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen, Venlo, Holanda) com modificações (20 µl de proteinase K no lugar de 2,5 mL e incubação a 65 ° C em vez de 60 ° C), método 1 DNAzol® (Villegas-Rivera et al. 2013), método 2 DNAzol® (Achilleos e Berthier 2013) e método CTAB (Lipp et al., 1999). Amostras de leite, iogurte comercial e da cultura bacteriana em caldo foram utilizadas para avaliar os protocolos de extração de DNA.

#### **4.2.5 Protocolo de extração de DNA da cultura bacteriana**

Para a extração de DNA genômico da cultura bacteriana pura em caldo, alíquotas de 2 mL do caldo (DO 0.8) foram centrifugadas (6000 g, 3 min, 4 °C) e os “pellets” formados foram armazenados a -80 °C até extração do DNA. O “pellet” foi ressuspensão em 100 µl de água ultrapura, congelado a -80 °C durante 20 minutos, e imediatamente aquecido em água a 100 °C durante 10 min (Pereira et al. 2014). A suspensão de células foi resfriada até temperatura ambiente, e centrifugada a 13.000 g por 10 s. O DNA foi extraído do sobrenadante utilizando o kit DNA Wizard® Genomic DNA purification (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop Thermo Scientific 2000 (Wilmington, DE, EUA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

#### **4.2.6 Protocolo de extração de DNA de iogurte: método DNAzol 2**

Para a extração de DNA genômico de iogurte, cultura iniciadora e bactérias probióticas ativadas no leite, foi utilizado o método adaptado de Achilleos e Berthier (2013), ao qual denominamos de DNAzol® método 2.

Em tubos de 50 mL foram adicionados 10 mL de iogurte ou amostras de leite (com bactérias probióticas), 25 mL NaCl 0,9%, 8 mL de citrato trissódico 25%, 2 g de polietilenoglicol 8000 e água, para um volume final de 50 mL. A mistura foi homogeneizada durante 5

minutos, separada em duas aliquotas de 25 mL e centrifugada (9700 g, 15 min, 4 ° C). Os pellets obtidos foram armazenados a -20 ° C até a extração de DNA. Os precipitados congelados foram descongelados durante 15 min a temperatura ambiente, suspensos em 1 mL de reagente DNAzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o protocolo foi seguido como descrito por Achilleos e Berthier (2013).

#### 4.2.7 PCR em tempo real ( qPCR)

A fim de detectar e quantificar *L. paracasei* em iogurte por qPCR, foi utilizado o par de iniciadores que amplifica um fragmento de 161 pb do gene *Tuf* (TCCGGGAAGTCTCAGC e TGTTCACGAACAGGTG) (Achilleos e Berthier 2013). A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços, com volume final de 25 µL utilizando o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As reações de amplificação foram realizadas em duplicata num volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 300 nM do iniciador *tufF* e 150 nM de *TufR*, água e DNA molde (10 ng).

O programa de amplificação foi: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min. O sinal de fluorescência foi medido ao final de cada passo de 60 °C. A análise da curva de dissociação foi realizada automaticamente pelo aquecimento contínuo a partir de 65 °C até 95 °C. Todas as corridas de PCR em tempo real foram analisadas utilizando-se as configurações automáticas do *software*.

#### 4.2.8 Construção das curvas padrão

As curvas padrão foram preparadas com diluições seriadas de DNA genômico isolado a partir da cultura pura de *L. paracasei* FNU, *L. paracasei* CCT 7501 e iogurte. O número de cópias do DNA bacteriano foi calculado com base no tamanho do genoma de *L. paracasei* cepa 8700: 2 (Número de acesso no GenBank NC\_022112.1) de 3,025 Mpb usando a constante de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$ ) e a massa molecular do DNA (660 Da/pb). Foi realizada a diluição seriada do DNA genômico em água ultra-pura a concentrações finais variando de  $10^7$  a  $10^0$  cópias do genoma, equivalentes a massas de 33,2 a  $3,32 \times 10^{-6}$  ng.

O Ct em função de log UFC de *L. paracasei* foi estimado utilizando DNA genômico extraído da cultura bacteriana na fase estacionária de

crescimento (DO=0.8) ou a partir de iogurte com *L. paracasei* FNU dia 1. Foram realizadas diluições seriadas de DNA extraídos de *L. paracasei* e as UFC correspondentes foram calculadas com base na contagem em placas da mesma amostra, cultura bacteriana ou iogurte com *L. paracasei* dia 1. As curvas padrão foram geradas através da plotagem dos valores do ciclo *threshold* (Ct) contra o logaritmo do número de cópias de DNA bacteriano (cultura pura) ou UFC (cultura pura e iogurte).

As eficiências de amplificação foram determinadas utilizando-se a seguinte equação:  $E=10^{(-1/s)} - 1$ , onde **E** é a eficiência e **s** é o coeficiente angular da reta gerada na curva padrão.

#### **4.2.9 Enumeração de *L. paracasei* por qPCR**

O DNA genômico foi extraído a partir do iogurte com *L. paracasei* (dia 1) e as diluições em série foram preparadas, equivalentes a massas de 33,2 a  $3,32 \times 10^{-6}$  ng do DNA total. Considerando o número de UFC obtido por enumeração em placas a partir da mesma amostra, UFC por reação foi calculada utilizando a plotagem Ct contra UFC.

Contagens bacterianas (UFC mL<sup>-1</sup>) no iogurte controle e no iogurte com *L. paracasei* coletados em diferentes dias foram determinadas usando a seguinte equação: Contagem bacteriana =  $A*B*C/D*E$ , onde A é UFC obtido a partir do Ct da amostra de DNA, utilizando curva padrão (Ct em função de log UFC), B é a concentração do DNA extraído (ng / µL), C é o volume total de DNA extraído (µL), D é a massa de DNA inicial utilizada na qPCR (ng) e E é o volume de iogurte (mL) utilizado na extração de DNA.

#### **4.2.10 Enumeração de *L. paracasei* por plaqueamento direto**

A enumeração de *L. paracasei* FNU em iogurte foi realizada como descrito previamente por Van de Castelee et al.(2006) com modificações. O iogurte controle foi preparado com a adição da cultura iniciadora termofílica e o iogurte com *L. paracasei* foi preparado com a adição de suspensão de *L. paracasei* FNU em leite UHT numa concentração final de 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. O meio *Lactobacillus casei* (LC) formulado por Ravula e Shah (1998) foi ajustado para pH 5,0, utilizando HCL 5M, e suplementado com uma solução de D Ribose a 10% esterilizada por filtração. (Sigma Aldrich) concentração final de 1% (v/v) e solução a 2% de verde bromocresol (Sigma Aldrich) concentração final de 0.04%.



Foram realizadas as diluições seriadas das amostras e alíquotas de 1 mL foram semeadas em profundidade em ágar LC com sobrecamada do mesmo ágar. As placas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas.

A enumeração de *L. paracasei* CCT 7501 e *L. paracasei* FNU em culturas puras foram realizadas em profundidade em ágar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) com sobrecamada de Ágar MRS e incubação durante 48 horas a 30 °C. As enumerações foram efetuadas em triplicata.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Comparação do rendimento e pureza do DNA extraído por meio de cinco protocolos

Foram testados cinco protocolos de extração de DNA, a partir de leite, iogurte e meio de cultura bacteriana e comparada a sua eficiência em relação ao rendimento e pureza do DNA extraído.

O primeiro protocolo testado foi DNeasy Mericon Food Kit, que forneceu um rendimento de DNA total muito baixo a partir de iogurte comercial (Tabela 4.1), apesar das modificações realizadas para este método. Usando o DNAzol método 1 (Villegas-Rivera et al. 2013) e método CTAB (Lipp et al., 1999), não foi possível extrair DNA de *L. paracasei* a partir da cultura bacteriana em caldo ou mesmo de *L. paracasei* em leite. Usando o DNAzol método 2 (Achilleos Berthier e 2013), as concentrações de DNA total obtidas a partir de iogurtes comerciais A e B foram maiores do que as concentrações de DNA obtidas a partir das mesmas amostras, usando o kit DNeasy Mericon modificado, embora a utilização do Kit DNeasy Mericon modificado tenha resultado melhor pureza do DNA.

Com relação ao rendimento de DNA a partir de leite contendo microrganismos (*L. paracasei* FNU, *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 ou cultura-mãe), as concentrações de DNA variaram de 27 a 371 ng.µL<sup>-1</sup> (Tabela 3.1).

Tabela 4.1: Rendimento e qualidade do DNA total obtido com cinco métodos de extração de DNA a partir de iogurte, leite e cultura bacteriana em caldo.

Método de extração	Amostra	Concentração DNA (ng/μL) <sup>d</sup>	Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> ) <sup>d</sup>
Dneasy Mericon Food Kit (Qiagen)	Iogurte A	5,0	1,36
	Iogurte B	2,0	2,09
Modified Dneasy Mericon Food Kit (Qiagen)	Iogurte A	4,65	1,85
	Iogurte B	5,1	1,86
	<i>L. paracasei</i> FNU em caldo	6,15	1,83
	<i>L. paracasei</i> FNU em caldo	Nd	Nd
DNAzol <sup>®</sup> método 1 <sup>a</sup>	<i>L. paracasei</i> FNU em leite UHT	Nd	Nd
	<i>L. paracasei</i> FNU em caldo	Nd	Nd
Método CTAB <sup>b</sup>	<i>L. paracasei</i> FNU em leite UHT	Nd	Nd
	<i>L. paracasei</i> FNU em caldo	Nd	Nd
DNAzol <sup>®</sup> método 2 <sup>c</sup>	Iogurte A	10,9	1,28
	Iogurte B	17,25	1,27
	<i>L. paracasei</i> FNU em Leite UHT	26,85	1,21
	<i>L. acidophilus</i> LA-5 em leite UHT	158,0	1,87
	<i>Bifidobacterium</i> BB-12 em leite UHT	134,05	1,64
	Cultura iniciadora em leite UHT	371,25	1,86

<sup>a</sup> (Villegas-Rivera, Vargas-Cabrera et al. 2013)

<sup>b</sup> (Lipp, Brodmann et al. 1999)

<sup>c</sup> (Achilleos and Berthier 2013)

<sup>d</sup> média de 2 extrações, nd= não detectado

Usando o DNAzol método 2, as concentrações de DNA total a partir de iogurte preparado com cultura iniciadora termófila, com ou sem adição de *L. paracasei*, variou entre 37 e 154 ng.μL<sup>-1</sup>. O DNA genômico de *L. paracasei*, *L. plantarum*, *E. coli*, *B. cereus* e *Pseudomonas spp.* foi extraído com sucesso a partir da cultura

bacteriana pura em caldo usando Kit Wizard e foram utilizados para testar a especificidade do iniciador.

#### 4.3.2 Especificidade do iniciador para *L. paracasei*

O teste de especificidade foi conduzido utilizando o DNA extraído de cepas de *L. paracasei* e outros gêneros para verificar se o par de iniciadores Tuf era apto a identificar somente *L. paracasei*. Para isso, utilizou-se DNA extraído da cultura bacteriana em caldo e em leite (10 ng de DNA molde). Cepas de *L. paracasei* FNU, CCT 7501 e LYO 750 apresentaram valores Ct (média  $\pm$  desvio padrão) igual a  $16,7 \pm 0,7$ ;  $18,2 \pm 0,4$  e  $15,7 \pm 0,2$ , respectivamente, e os fragmentos amplificados apresentaram Tm de  $78,3 \pm 0,2$ ;  $78,2 \pm 0,4$  e  $78,2 \pm 0,2$ , respectivamente (Tabela 4.2). Não foi verificado amplificação nos ensaios de qPCR para *Bifidobacterium* BB-12 e *L. plantarum*.

Outras amostras negativas apresentaram alguma amplificação inespecífica, com Ct tardio e diferentes valores de Tm em relação ao Tm para *L. paracasei* de 78,2. *Bacillus cereus* apresentou 2 positivos de 6 repetições, com Ct maior do que 31,7. Cultura iniciadora (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*) apresentou três positivos num total de 6 repetições, com Ct tardio (Ct > 38,4) e diferentes valores de Tm. *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *L. acidophilus* também apresentaram amplificação inespecífica com valores de Ct tardios (Tabela 3.4).

*L. acidophilus* mostrou um Ct tardio (Ct > 34,3) em 3 reações das seis repetições. *E. coli* e *Pseudomonas* apresentaram Ct tardios (Ct > 33,9 e Ct > 32,7, respectivamente) para todas as 6 repetições com diferentes valores de Tm.

Tabela 4.2: Ct e Tm obtidos por qPCR utilizando DNA extraído de *L. paracasei* (controles positivos) e outras espécies bacterianas (controles negativos).

Amostra*	Ct	Tm1	Tm2	Tm3	Amostra*	Ct	Tm1	Tm2	Tm3
<i>L. paracasei</i> FNU	17,83	78,01			<i>Pseudo monas</i> spp	32,91	76,88	67,37	
	16,61	78,20				32,65	75,78	86,75	67,73
	16,82	78,39				32,78	85,47	77,61	
	16,23	78,39				33,47	85,65	67,00	
	16,26	78,39				35,89	77,06	72,12	
	16,42	78,39				36,88	77,06	64,32	
<i>L. paracasei</i> CCT 7501	19,00	77,63			<i>Bifidoba cterium</i> BB12	Nd	nd		
	24,02	77,82				Nd	nd		
	16,74	78,16				nd	nd		
	16,63	78,34				Nd	nd		
	16,50	78,52				Nd	nd		
	16,47	78,52				Nd	nd		
<i>L. paracasei</i> LYO 750	15,94	78,01			<i>L. acidophil lus</i> LA- 5	Nd	nd		
	16,00	78,20				39,06	72,69		
	15,40	78,52				34,28	78,3	65,55	
	15,42	78,34				Nd	nd		
	15,48	78,16				36,41	74,24	78,44	64,7
	15,69	77,97				36,04	72,91	79,59	
<i>Bacillus cereus</i>	33,98	77,82			<i>L. planta rum</i>	Nd	nd		
	nd	nd				Nd	nd		
	31,68	78,01				Nd	nd		
	nd	nd				Nd	nd		
	nd	nd				Nd	nd		
	nd	nd				Nd	nd		
<i>Escheri chia coli</i>	33,87	77,79	65,90		Cultura “starter”	38,34	73,42		
	35,35	79,07	65,54	84,74		39,61	73,42		
	37,92	63,89				Nd	nd		
	35,30	84,56	65,54			39,53	81,07		
	35,29	65,90	81,26	84,92		Nd	nd		
	37,96	63,71				Nd	nd		

\*10 ng de DNA molde, nd = não detectado com Ct > 40.

### 4.3.3 Parâmetros da qPCR para enumeração de *L.paracasei*

Os parâmetros de reação (eficiência e coeficiente de correlação) do ensaio de qPCR utilizando par de iniciadores Tuf foram determinados com base nas curvas padrão obtidas a partir das diluições seriadas do DNA bacteriano extraído a partir de uma cultura pura de *L. paracasei* CCT 7501 (Fig. 4.1) e *L. paracasei* FNU (Fig. 4.2A), realizada em três e cinco corridas de qPCR, respectivamente, em diferentes dias. As curvas padrão apresentaram coeficiente de correlação linear e eficiência média (E) adequados,  $R^2 > 0,93$  e E de 91% para *L. paracasei* CCT 7501 e  $R^2 > 0,95$  e E de 95% para *L. paracasei* FNU (Tabela 4.3). O limite de detecção (LOD) para ambas as cepas de *L. paracasei* foi de  $10^3$  cópias de DNA, o que corresponde a 3,32 pg de DNA. Para *L. paracasei* FNU, o LOD correspondeu a um Ct médio de 29,1. A curva de Ct contra log UFC de *L.paracasei* FNU (Fig. 4.2B) foi estimado utilizando DNA genômico extraído da cultura pura de *L.paracasei* FNU, com base na contagem em placas da cultura bacteriana, que foi realizada em paralelo, de modo que foram realizadas diluições seriadas do DNA bacteriano e os valores correspondentes de UFC foram calculados com base na contagem em placas. LOD correspondeu a 2,78 log UFC de *L.paracasei* (Fig. 4.2B).

Figura 4.1: Curva padrão de qPCR para *L. paracasei* CCT 7501, obtida a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias.

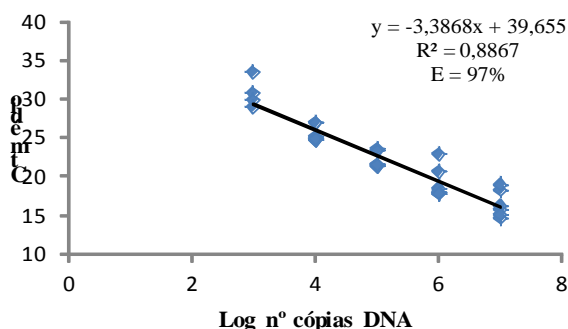


Tabela 4.3: Eficiências (E%) e Coeficientes de Correlação ( $R^2$ ) das curvas padrão de *L. paracasei* CCT 7501 e *L. paracasei* FNU realizadas em diferentes dias.

	<i>L. paracasei</i> CCT 7501		<i>L. paracasei</i> FNU	
	E (%)	$R^2$	E (%)	$R^2$
Dia 1	90	0,963	95	0,996
Dia 2	93	0,937	116	0,954
Dia 3	89	0,986	87	0,989
Dia 4	-	-	81	0,958
Dia 5	-	-	95	0,998
Média	91	0,962	95	0,979
DP	2,08	0,02	13,24	0,02

A fim de avaliar o efeito da presença do DNA de outros micro-organismos, foi feita uma enumeração de *L. paracasei* por qPCR em amostras de iogurte, o valor da eficiência de amplificação foi determinada pela construção da curva padrão de diluição seriada de DNA extraído de iogurte preparado com *L. paracasei* (dia 1). Neste caso, a eficiência foi de 103% e  $R^2$  foi de 0,98 (Fig. 4.3), enquanto que para a amostra de iogurte (dia 1) o log UFC foi calculado com base na contagem em placas.

Figura 4.2: Curvas padrão para *L. paracasei* FNU, obtidas a partir de cinco corridas de qPCR em diferentes dias, DNA extraído a partir de meio de cultura. (A) Ct versus log n° de cópias de DNA e (B) Ct versus log UFC de *L. paracasei* FNU.

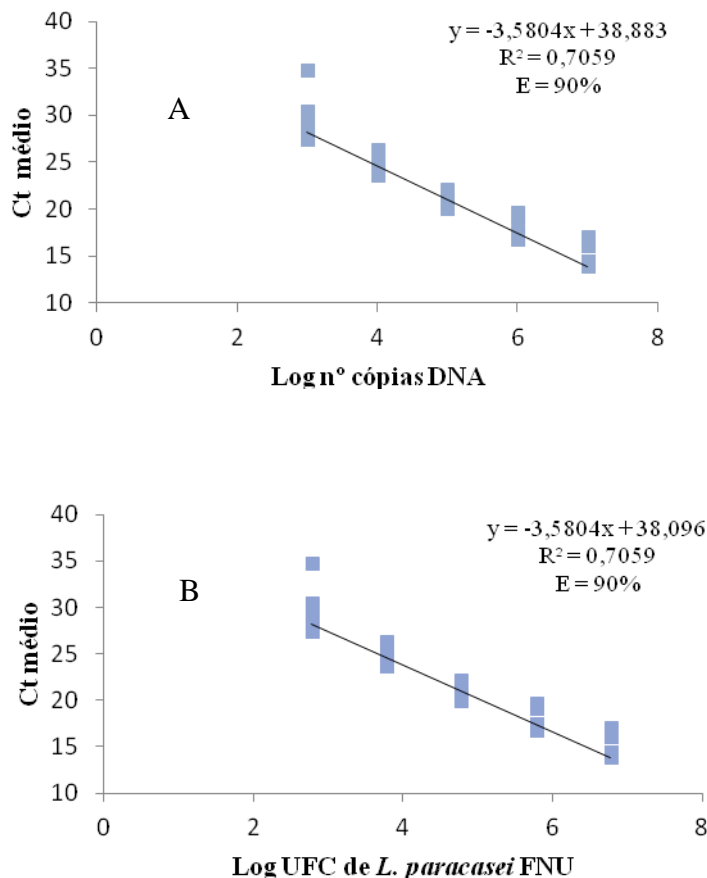
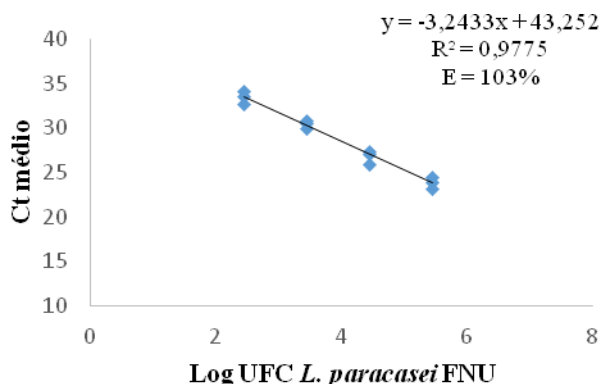


Figura 4.3 Curva padrão para qPCR de *L. paracasei* FNU obtidas a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias, DNA extraído de iogurte com *L. paracasei* FNU dia 1.



#### 4.3.4 Enumeração de *L. paracasei* em amostras de iogurte

A média da contagem em placas de *L. paracasei* FNU na cultura UHT congelada utilizada na preparação do iogurte foi de  $9,13 \log \text{UFC mL}^{-1}$ .

Amostras de iogurte foram coletadas em intervalos de sete dias a contar da data da preparação (1, 7, 14, 21 e 28 dias). A enumeração de *L. paracasei* foi realizada através de plaqueamento direto e qPCR.

O DNA foi extraído em duplicata para cada amostra utilizando o método DNAzol 2 e submetido ao ensaio de qPCR (Tabela 4.4). Amostras de iogurte controle coletados em 1, 7, 14, 21 e 28 dias não apresentaram amplificação ou apresentaram amplificação inespecífica com Ct tardio ( $C_t > 31,9$ ).



Tabela 4.4: Ct médio e Tm obtidos por qPCR usando DNA extraído a partir de iogurte controle e iogurte com *L. paracasei* FNU.

Amostra	Ct	Tm1	Tm2	Amostra	Ct	Tm1	Tm2
Iogurte controle				Iogurte com <i>L. paracasei</i>			
Dia 1	32.94	73.57		Dia 1	23.22	78.78	
	31.9	73.38			22.14	78.78	
	nd	nd			21.84	78.81	
	37.05	80.12			22.28	78.81	
	34.10	71.76	83.40		24.22	78.72	74.14
	35.69	78.82	71.76		23.57	78.72	73.57
Dia 7	31.87	73.57		Dia 7	21.19	78.72	73.38
	33.20	73.38			20.83	78.72	
	38.54	62.31			19.16	78.59	
	32.52	78.39			18.70	78.59	
	37.52	72.95			17.85	78.23	
	37.90	64.34			18.22	78.23	
Dia 14	32.35	73.57		Dia 14	20.50	78.72	
	32.62	73.76			20.09	78.72	
	39.04	72.27			18.60	78.59	
	36.81	74.57			18.62	78.59	
	Nd	nd			19.39	78.42	
	Nd	nd			18.87	78.23	
Dia 21	32.67	73.95		Dia 21	23.87	78.72	
	32.24	73.57			24.36	78.53	73.38
	Nd	nd			22.56	78.78	
	Nd	nd			22.39	78.59	
	Nd	nd			22.90	78.44	
	Nd	nd			22.75	78.44	
Dia 28	32.46	73.57		Dia 28	21.25	78.16	
	33.27	73.57			20.35	78.16	
	Nd	nd			19.77	78.59	
	35.38	74.37			19.83	78.59	
	Nd	nd			19.51	78.44	
	Nd	nd			19.74	78.44	

\*nd = não detectado com Ct > 40.

Os valores de  $T_m$  das amostras de iogurte controle foram diferentes dos valores de  $T_m$  das amostras de iogurte com *L. paracasei*, que apresenta um  $T_m$  médio de  $78,3 \pm 0,2$  (tabela 4.2), e também foram diferentes dos valores de  $T_m$  obtidos nas amostras de iogurte contendo *L. paracasei*, que apresentaram valor médio de  $T_m$  de  $78,6 \pm 0,2$  (tabela 4.4).

Em relação às amostras de iogurte com *L. paracasei* os valores de  $C_t$  variaram de 18,9 a 23,4 e todas as repetições apresentaram amplificação com  $T_m$  semelhantes com média de  $78,6 \pm 0,2$ .

As curvas padrão de  $C_t$  versus log UFC das amostras de iogurte preparadas com *L. paracasei* dia 1 (Fig. 4.3) foi utilizada para calcular a UFC em cada reação para as amostras de iogurte, com base nos valores de  $C_t$ . Foi possível determinar a quantidade de *L. paracasei* (UFC.ml<sup>-1</sup> de iogurte) em iogurtes utilizando a qPCR e a equação 2 apresentada no tópico “material e métodos”. A enumeração bacteriana por contagem em placa foi obtida das mesmas amostras de iogurte (tabela 4.5), com base na metodologia descrita por Van de Castele et al. (2006). Os resultados de contagem de *L. paracasei* por qPCR e contagem em placa foram similares para amostras coletadas aos 7, 14 e 21 dias após o preparo do iogurte (tabela 4.5). Entretanto, a enumeração de *L. paracasei* por contagem em placa (log 7,75 UFC.ml<sup>-1</sup>) foi inferior à contagem por qPCR (log 9,73 UFC.ml<sup>-1</sup>) para as amostras coletadas 28 dias após o preparo do iogurte.

Tabela 4.5 Comparação das contagens de *L. paracasei* FNU (log UFC/mL) obtidas por qPCR e contagem em placas.

Amostra	Contagem por qPCR (log UFC/mL) <sup>a</sup>	Contagem em placa (log UFC/mL) <sup>b</sup>
Iogurte c/ <i>L. paracasei</i> – Dia 1	-	8,17±0,09
Iogurte c/ <i>L. paracasei</i> – Dia 7	9,48±0,47	9,12±0,15
Iogurte c/ <i>L. paracasei</i> – Dia 14	9,40±0,27	8,81±0,72
Iogurte c/ <i>L. paracasei</i> – Dia 21	8,30±0,27	7,95±0,05
Iogurte c/ <i>L. paracasei</i> – Dia 28	9,73±0,30	7,75±0,15*

<sup>a</sup> média ±DP calculados a partir de 3 diferentes corridas de qPCR.

<sup>b</sup> média ±DP das contagens em placa em triplicata

\* A significância das diferenças ( $P < 0,05$ ) entre qPCR e contagem em placas foi avaliada pelo teste  $t$  de Student.

## 4.4 DISCUSSÃO

O primeiro requisito para a quantificação bacteriana em alimentos através de métodos baseados em abordagens moleculares, é o estabelecimento de um método de extração de DNA eficiente (Garcia et al 2013; Oliveira et al.2013; Quigley et al. 2012). Na extração do DNA bacteriano a partir de um produto lácteo é um desafio especial obter DNA sem inibidores da PCR, como cálcio e gordura (Pirondini et ai. 2010). No presente estudo, cinco protocolos foram avaliados para comparar sua eficácia no que diz respeito à extração de DNA a partir de iogurte. Utilizando DNAzol método 2, as concentrações de DNA total a partir de iogurtes comerciais foram maiores do que as concentrações de DNA total obtidas pelos outros métodos testados (Tabela 4.1). O DNAzol método 2 foi escolhido para extração de DNA de iogurte, porque foi usado com sucesso para a contagem de *Lactobacillus paracasei* e *Lactococcus lactis* por qPCR em queijo (Achilleos e Berthier 2013). Várias bactérias lácticas foram testadas como controle negativo por Achilleos e Berthier (2013) e o ensaio de qPCR utilizando iniciadores Tuf foi suficientemente específico para a identificação de *L. paracasei*.

Foi testada a especificidade destes iniciadores utilizando outras espécies bacterianas (Tabela 4.2), algumas espécies bacterianas apresentaram amplificação não específica, no entanto os valores de Ct foram sempre acima do valor Ct correspondente a LOD (Ct = 29) e eles apresentaram diferentes valores de Tm em comparação com amostras de *L. paracasei*. O  $\Delta Ct$  observado entre amostras de DNA (10 ng) de cepas de *L. paracasei* (Ct <24) e outras bactérias (Ct> 31) é suficiente para reforçar o uso deste par de iniciadores Tuf porque as amplificações de outro DNA bacteriano são inespecíficos e se distinguem facilmente pela seu Tm. Amplificação inespecífica de outros DNAs bacterianos com Ct tardio também foi observado para os ensaios de qPCR para o gene tuf desenvolvido para *L. helveticus* e *L. rhamnosus*, mesmo usando sonda de hidrólise (Desfosses-Foucault et al. 2012). A escolha do método de extração de DNA pode influenciar a quantificação por PCR em tempo real e é essencial que o procedimento resulte num rendimento ótimo de DNA e na remoção de substâncias que poderiam influenciar na eficiência da PCR (Cankar et al., 2006; Rodriguez-Lázaro et ai. 2007). Comparando os valores de eficiência da qPCR obtidos para este ensaio quando o DNA-alvo é extraído a partir de culturas puras de *L. paracasei* (Tabela 4.3 e fig. 4.2) ou DNA extraído de iogurte preparado com *L. paracasei* (Fig. 4.3), as curvas padrão apresentaram valores médios de

eficiência de 91% (cepa pura CTT 7501), 95% (FNU cepa pura) e 103% (iogurte com a cepa FNU), os valores de eficiência adequados devem estar entre 90% e 110% (Rodriguez et al. 2012). Os valores de eficiência de qPCR obtidos por (Achilleos e Berthier 2013) variou entre 81,1% e 99,5% para o ensaio de qPCR utilizando o gene Tuf para *L. paracasei*.

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de amostra que pode ser detectada com confiança. Neste ensaio qPCR, o LOD corresponde a  $10^3$  cópias de DNA. Este ensaio de qPCR permitiu detectar com confiança DNA de *L. paracasei* na faixa de  $10^7$  cópias de DNA (33,2 ng) a  $10^3$  cópias de DNA (3,32 ng). Essa faixa de amplificação ( $10^7$  a  $10^3$  cópias de DNA) é uma faixa adequada para contagem de bactérias probióticas em amostras de iogurte, já que essas bactérias devem estar presentes em grandes quantidades nesses produtos. Resultados similares aos nossos foram obtidos em ensaio de qPCR tendo como alvo o gene Tuf para a detecção de *L. helveticus* e *L. rhamnosus*, que apresentaram uma faixa de amplificação de  $10^8$  a  $10^3$  cópias de DNA (Desfosses-Foucault et al., 2012).

A enumeração de *L. paracasei* (UFC) por qPCR foi comparada a enumeração por contagem em placas das células viáveis de *L. paracasei* em diferentes dias de armazenamento de iogurte (Tabela 4.5).

Foram observadas diferenças entre qPCR e contagens em placas apenas 28 dias após a preparação do iogurte, as contagens foram semelhantes nos dias 7, 14 e 21. A diferença estatisticamente significativa entre qPCR e contagem em placas a 28 dias de armazenamento pode ser explicada pela presença de células não viáveis, que não poderiam ser distinguidas de células cultiváveis através do ensaio de qPCR pois este amplifica o DNA de ambas as células viáveis e não viáveis. Uma alternativa seria a utilização de corantes intercalantes de DNA das células não viáveis como etídio monoazida e propídio monoazida (Barbeau-Piednoir et al 2014; Elizaquível et al 2014). Neste estudo, a contagem de *L. paracasei* em iogurte por qPCR foi conseguida com sucesso. Em conclusão, qPCR é uma ferramenta útil e rápida para enumerar *L. paracasei* em iogurte, embora não seja capaz de distinguir entre células viáveis e não viáveis.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

Achilleos C, Berthier F (2013) Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples Food Microbiology 36:286-295 doi:10.1016/j.fm.2013.06.024

Agrimonti C, Bortolazzi L, Maestri E, Sanangelantoni A, Marmiroli N (2013) A Real-Time PCR/SYBR Green I Method for the Rapid Quantification of *Salmonella enterica* in Poultry Meat Food Anal Meth 6:1004-1015 doi:10.1007/s12161-013-9583-y

Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N (2014) Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar *enteritidis* Journal of Microbiological Methods 103:131-137 doi:10.1016/j.mimet.2014.06.003

Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms BMC Biotechnology 6 doi:3710.1186/1472-6750-6-37

Chavagnat F, Haueter M, Jimeno J, Casey MG (2002) Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli FEMS Microbiol Lett 217:177-183 doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11472.x

Chiang S-S, Pan T-M (2012) Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products Applied Microbiology and Biotechnology 93:903-916 doi:10.1007/s00253-011-3753-x

De Medici D et al. (2014) Rapid Methods for Quality Assurance of Foods: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring Food Anal Meth:1-17 doi:10.1007/s12161-014-9915-6

Desfosses-Foucault E, Dussault-Lepage V, Le Boucher C, Savard P, La Pointe G, Roy D (2012) Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification Frontiers in Microbiology 3 doi:10.3389/fmicb.2012.00350

Elizaquivel P, Aznar R, Sanchez G (2014) Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field Journal of Applied Microbiology 116:1-13 doi:10.1111/jam.12365

Furet JP, Quenee P, Tailliez P (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative

PCR International Journal of Food Microbiology 97:197-207  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.020

Garcia A, Kamara J, Vigre H, Hoorfar J, Josefsen M (2013) Direct Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal Samples Using Real-Time PCR: Evaluation of Six Rapid DNA Extraction Methods Food Anal Meth 6:1728-1738 doi:10.1007/s12161-013-9685-6

Herbel SR, Lauzat B, von Nickisch-Rosenegk M, Kuhn M, Murugaiyan J, Wieler LH, Guenther S (2013) Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR Journal of Applied Microbiology 115:1402-1410 doi:10.1111/jam.12341

Ilha E, da Silva T, Lorenz J, de Oliveira Rocha G, Sant'Anna E (2014) *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey European Food Research and Technology:1-8 doi:10.1007/s00217-014-2402-x

Kao Y-T, Liu Y-S, Shyu Y-T (2007) Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis Food Research International 40:71-79 doi:10.1016/j.foodres.2006.07.018

Kristo E, Biliaderis CG, Tzanetakis N (2003) Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* International Dairy Journal 13:517-528 doi:10.1016/s0958-6946(03)00074-8

Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder Journal of Aoac International 82:923-928

Machado SG, Soares Bazzolli DM, Dantas Vanetti MC (2013) Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk International Dairy Journal 29:8-14 doi:10.1016/j.idairyj.2012.09.007

Oliveira J, Cunha Â, Almeida A, Castilho F, Pereira M (2013) Comparison of Methodologies for the Extraction of Bacterial DNA from

Mussels—Relevance for Food Safety Food Anal Meth 6:201-209  
doi:10.1007/s12161-012-9419-1

Pereira TP, do Amaral FP, Dall'Asta P, Angonesi Brod FC, Maisonnave Arisi AC (2014) RealTime PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots Molecular Biotechnology 56:660-670 doi:10.1007/s12033-014-9742-4

Pirondini A, Bonas U, Maestri E, Visioli G, Marmiroli M, Marmiroli N (2010) Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain Food Control 21:663-668  
doi:10.1016/j.foodcont.2009.10.004

Poltronieri P, D'Urso OF, Blaiotta G, Morea M (2008) DNA Arrays and Membrane Hybridization Methods for Screening of Six *Lactobacillus* Species Common in Food Products Food Anal Meth 1:171-180

Quigley L, O'Sullivan O, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2012) A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese Journal of Applied Microbiology 113:96-105 doi:10.1111/j.1365- 2672.2012.05294.x

Ravula RR, Shah NP (1998) Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks Biotechnology Techniques 12:819-822

Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-García P, Valero A, Hernandez M (2014) Application of the SureTect Detection Methods for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in Meat, Dairy, Fish, and Vegetable Products Food Anal Meth:1-6 doi:10.1007/s12161-014-9970-z

Rodriguez-Lazaro D et al. (2007) Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms Trends in Food Science & Technology 18:306-319  
doi:10.1016/j.tifs.2007.01.009

Rodríguez A, Córdoba J, Gordillo R, Córdoba M, Rodríguez M (2012) Development of Two Quantitative Real-Time PCR Methods Based on SYBR Green and TaqMan to Quantify Sterigmatocystin-Producing

Molds in Foods Food Anal Meth 5:1514-1525 doi:10.1007/s12161-012-9411-9

Roy D (2005) Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products Lait 85:39-56

Van de Castele S, Vanheuverzwijn T, Ruysen T, Van Assche P, Swings J, Huys G (2006) Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters International Dairy Journal 16:1470-1476 doi:10.1016/j.idairyj.2005.012.002

Villegas-Rivera G et al. (2013) Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial populations World Journal of Microbiology & Biotechnology 29:301-307 doi:10.1007/s11274-012-1183-2

Xue C et al. (2014) Protective action of S-layer proteins from *Lactobacillus paracasei* M7 against *Salmonella* infection and mediated inhibition of *Salmonella*-induced apoptosis European Food Research and Technology:1-7 doi:10.1007/s00217-014-2396-4

Yu J, Sun Z, Liu W, Bao Q, Zhang J, Zhang H (2012) Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial hsp60, pheS and tuf gene sequences European Food Research and Technology 234:927-934 doi:10.1007/s00217-012-1712-0





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a cepa de *L. paracasei* FNU demonstrou possuir resistência “in vitro” aos sais biliares e a baixo pH, características importantes para a sobrevivência da bactéria no trato digestório humano e foi capaz de produzir substâncias inibidoras contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella*,). A utilização desta cepa na produção de fermentos para pães pode ser útil no sentido de inibir microrganismos indesejáveis neste segmento tais como *Bacillus subtilis*. Esta cepa também manteve sua viabilidade em iogurte por um período de, no mínimo, 28 dias. Sendo assim, podemos afirmar que *L. paracasei* FNU demonstrou possuir algumas características desejáveis para ser utilizado como probiótico em alimentos.

A microencapsulação por “spray drying” em leite em pó desnatado e soro do leite proporcionou às células uma boa proteção contra os sais biliares e a pH ácido, provando que o soro de leite na sua forma líquida em conjunto com o leite em pó desnatado, na proporção utilizada, é um agente encapsulante promissor para bactérias probióticas. Estes resultados incentivam estudos posteriores no sentido de avaliar a estabilidade das microcápsulas adicionadas a diferentes matrizes alimentares.

O ensaio de qPCR utilizado para quantificar o DNA bacteriano de *L. paracasei* FNU se mostrou eficiente, demonstrando que o gene *tuf* é um alvo adequado para a identificação e quantificação específica de *L. paracasei* em amostras de iogurte. Foram observadas diferenças entre qPCR e contagens em placa apenas 28 dias após a preparação do iogurte, as contagens foram semelhantes aos 7, 14 e 21 dias, devido ao fato de que o ensaio de qPCR não diferenciou as células viáveis de não viáveis. Neste sentido, novas pesquisas visando a detecção seletiva de DNA de células viáveis de *L. paracasei* em matrizes alimentares serão de grande utilidade no monitoramento da vida de prateleira de alimentos funcionais que contenham este microrganismo.

Estudos futuros podem ser úteis para determinar o potencial probiótico de *L. paracasei* FNU, estudando a hidrofobicidade, auto-agregação, co-agregação, suscetibilidade a antimicrobianos, bem como o seu comportamento em processos fermentativos.



# ANEXO A comprovante de publicação do artigo “*Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey”.

Author's personal copy

Eur Food Res Technol (2015) 240:977–984  
DOI 10.1007/s00217-014-2402-x

ORIGINAL PAPER

## *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey

Eunice Cassanego Ilha · Tiago da Silva ·  
Juliana Goulart Lorenz · Gabriela de Oliveira Rocha ·  
Ernani S. Sant'Anna

Received: 18 August 2014 / Revised: 21 November 2014 / Accepted: 26 November 2014 / Published online: 6 December 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Lactic acid bacteria have been isolated from sourdough and could present important properties in food manufacturing as starter cultures and also as probiotics. This study evaluated the resistance of *Lactobacillus paracasei* strain isolated from sourdough to spray drying in the presence of reconstituted skim milk (RSM) and cheese whey (CW). The in vitro tolerance to acid, bile, sodium chloride (NaCl) and heat was studied to free and microencapsulated cells. The microcapsules moisture was determined, and the morphology was observed by scanning electron microscopy. The viability of free and microencapsulated cells decreased by  $4.25 \log \text{CFU mL}^{-1}$  and  $1.00 \log \text{CFU g}^{-1}$ , respectively, when exposed to pH 2.0 for 3 h. At pH 3.0, free cells decreased  $0.3 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , while the microencapsulated form maintained its viability even after 3 h of exposure. After 12 h of exposure to 2 g  $100 \text{ mL}^{-1}$  bile salts, free and microencapsulated *L. paracasei* decreased  $3.34 \log \text{CFU mL}^{-1}$  and  $2.17 \log \text{CFU g}^{-1}$ , respectively. No significant cell loss was observed, for free and microencapsulated form when exposed to NaCl, and microencapsulated cells survived well for 15 min at  $65^\circ\text{C}$ . Moisture content of microcapsules ranged from 4.30 to  $4.77 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . *L. paracasei* was found to possess desirable in vitro resistance to low pH and bile salts, and the microencapsulation in RSM and CW provided a cell protection against acidic pH and bile salts. This strain is good candidate for further investigation to elucidate its potential health benefits and in fermentation processes.

**Keywords** Microencapsulation · Probiotic · *Lactobacillus paracasei* · Whey

### Introduction

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host [1]. Most probiotic bacteria belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* are Gram-positive lactic acid-producing bacteria that constitute a major part of the normal intestinal microbiota in animals and humans. *Lactobacilli* are found in a variety of habitats where rich, carbohydrate-containing substrates are available, such as human and animal mucosal membranes, on plants or material of plant origin, sewage and fermented milk products, and fermenting or spoiling food [2].

Researchers have reported the benefits of probiotics in outbreaks of diarrhea. The emergence of probiotic foods which are scientifically validated for their efficacy and defined health benefits offers an excellent opportunity to improve public health [3]. According Gregoret et al. [4], although there are several probiotic strains available for commercial use worldwide, the isolation and characterization of new strains is still desirable, mainly in Developing Countries.

Different strains of lactic acid bacteria (LAB) have been isolated from sourdough and could present many important properties in food manufacturing as starter cultures and also as probiotics. *Lactobacillus paracasei* strains have shown “in vitro” probiotics properties when isolated from human [5, 6], fermented soybean [7], and olives [8]. Some scientific reports have demonstrated the beneficial effects of strains of *L. paracasei* on the host, including increase in

E. C. Ilha (✉) · T. da Silva · J. G. Lorenz · G. de Oliveira Rocha ·  
E. S. Sant'Anna  
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro  
de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina,  
Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, Santa Catarina  
88034-001, Brazil  
e-mail: e.c.ilha@ufsc.br



ANEXO B Comprovante de submissão do artigo “Comparison of bacterial DNA extraction methods and comparison of Real-time PCR assay and plate count for *L. paracasei* enumeration in yoghurt” (Título corrigido conforme sugestão dos revisores)

28/05/2015

- confirmation



Assunto **- confirmation**  
De Annals of Microbiology - Editorial Office <em@editorialmanager.com>  
Remetente <em.anmi.0.420303.956b38b4@editorialmanager.com>  
Para Eunice Cassanego Ilha <e.cilha@ufsc.br>  
Responder para Annals of Microbiology - Editorial Office <belle.mojado@springer.com>  
Data 24.03.2015 16:57

---

ANMI: 'Real-time PCR assay for *L. paracasei* enumeration in yoghurt'

Dear Eunice Ilha,

We have just received the submission entitled: "Real-time PCR assay for *L. paracasei* enumeration in yoghurt" for possible publication in Annals of Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

Could you please verify that you have read this manuscript and that you approve of its submission? Please respond through the links below.

To approve the submission and confirm co-authorship:

<http://arml.edmgr.com/?i=49026&i=7X580TNN>

If you do not approve the submission or co-authorship, please click this link:

<http://arml.edmgr.com/?i=49027&i=VJ8FH4X8>

Thank you very much for your kind attention and cooperation.

Best regards,

Springer Journals Editorial Office  
Annals of Microbiology